



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2012

**Lisandra Sofia
Lopes Vilaça**

Falsos positivos no teste de rastreio para o VIH



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2012

**Lisandra Sofia
Lopes Vilaça**

Falsos positivos no teste de rastreio para o VIH

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Dr.^a Lúcia Borges, Diretora do Serviço de Imuno-Hematologia do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E- Aveiro e da Professora Doutora Rita Ferreira do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família e aos meus amigos pelo seu apoio incondicional ao longo da minha vida.

o júri
presidente

Prof. Doutor Pedro Domingues
Professor coordenador do Mestrado de Bioquímica

Dr.^a Célia Oliveira
Diretora do serviço de Infeciologia do Hospital Infante D. Pedro de Aveiro

Dr.^a Lúcia Borges
Diretora do serviço de Imuno-hemoterapia do Hospital D. Pedro de Aveiro

Prof. Doutora Rita Ferreira
Professora orientadora desta dissertação

agradecimentos

À Professora Doutora Rita Ferreira e à Dr.^a Lúcia Borges, obrigada por toda a ajuda prestada, disponibilidade, motivação, paciência e orientação ao longo de todo o trabalho.

À Dr.^a Elizabeth Mesquita, pela sua disponibilidade, generosidade, motivação e boa disposição ao longo de todo o trabalho

Ao Dr. Daniel Coutinho, pela sua paciência, disponibilidade, motivação, simpatia e ajuda no desempenho deste trabalho

A todos os técnicos do serviço de imuno- hemoterapia, pela ajuda, motivação, disponibilidade e pelo bom ambiente, em especial à Anabela e à Filipa.

À Mara e ao Hugo, meus companheiros de trabalho, pelo incentivo, conversas partilhadas, ajuda e os bons momentos que me proporcionaram.

À minha família, principalmente aos meus pais, pelo seu apoio incondicional, incentivo, confiança, carinho, fazendo-me sempre acreditar que eu era capaz.

À Mara, acima de tudo pela sua amizade, muita paciência, pelos conselhos, pelas conversas partilhas, por ser uma grande companheira de casa, pelas risadas e momentos em que precisei estar sempre por perto e sempre a apoiar-me. Muito obrigada por seres a amiga que és, pela pessoa em que te tornaste e por fazeres parte da “família”.

Ao João e à Natacha, a restante “família”, por serem bons ouvintes, pela atenção que me deram, pelas conversas partilhadas, pelos conselhos, pelo grande incentivo que me deram nos momentos menos bons que tive, por serem dois dos meus grandes amigos.

Aos restantes amigos, por me apoiarem, por serem bons ouvintes, pelos conselhos e pelo carinho.

palavras-chave

Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), testes de rastreio para o VIH, falsos-positivos.

resumo

O número de indivíduos infetados pelo VIH têm vindo a aumentar ao longo dos anos. Perante a gravidade e o estigma criado em torno desta doença, há um crescente interesse na compreensão da ocorrência de falsos positivos nos testes de rastreio para o VIH, dada a implicação deste resultado na vida de um indivíduo.

Assim, este trabalho foca-se na análise dos resultados falsos positivos obtidos no teste de rastreio para o VIH no sentido de estudar a prevalência, destes resultados na população estudada, relacionar os dados demográficos (género e faixa etária), dados clínicos (diagnóstico, antecedentes pessoais, medicação crónica, possíveis fatores de risco), bem como alguns dos parâmetros laboratoriais. Além disso, pretende analisar mais pormenorizadamente a população de grávidas e os resultados do teste do Citomegalovírus. Os resultados obtidos evidenciaram que os indivíduos que apresentavam um resultado falso positivo eram maioritariamente do sexo feminino e compreendidos entre os 21-30 e 51-60 anos, parecendo ser predominante na idade fértil e no início da menopausa. Os indivíduos do sexo masculino predominam em idades muito jovens e muito avançadas. Em 24% dos indivíduos, a condição mais associada aos falsos positivos, foi a gravidez. Os problemas cardiovasculares e respiratórios foram os mais frequentes na população de falsos positivos, assim como as alterações laboratoriais observadas eram indicativas de doença hepática. Na avaliação da *performance* dos métodos usados observou-se um maior número de falsos positivos nos resultados por quimioluminescência do que por ELFA. Relativamente à prevalência dos resultados do CMV verificou-se que alguns indivíduos apresentavam imunidade para o CMV e apenas um doente apresentou infeção aguda pelo CMV.

Verifica-se que o número de falsos positivos (0,46%) no teste de rastreio pelo VIH analisados neste estudo é bastante significativo e parece estar associado a condições como a gravidez e o CMV. Estudos futuros serão importantes para uma melhor compreensão de um resultado falso positivo num teste de rastreio para o VIH, com vista à otimização destes testes e à diminuição dos efeitos subjacentes a um resultado deste tipo.

keywords

Human immunodeficiency virus (HIV), HIV detection tests, false positives

abstract

The numbers of individuals affected by HIV infection have been increasing over the years. In view of the gravity and the stigma created around this disease, there is a growing interest in understanding the occurrence of false positives in diagnosis tests, given the implication of this result on the life of an individual. This work focuses on the analysis of false positive results obtained in the screening test for HIV in order to study the prevalence of these findings in the study population, relate the demographic data (gender and age), clinical data (diagnosis, personal history, chronic medication, possible risk factors) as well as some of the parameters laboratory. It also aims to investigate further the population of pregnant and the test results of cytomegalovirus. It was found that individuals who had a false positive result were mostly female and included among the 21-30 and 51-60 years seems to be predominant in fertile age and early menopause. The males are more common among very young and very advanced. In 24% of individuals the condition most often associated with false positives was pregnant. The cardiovascular and respiratory problems were most frequent in the population, as well as laboratory abnormalities observed were indicative of liver disease. In evaluating the performance of the methods used noted that the number of false positives by chemiluminescence was much higher than for ELFA. For the prevalence of the results of CMV was found that some individuals had immunity for CMV and only one patient acute CMV infection. It is noted that the number of false positives (0.46%) in the screening test discussed HIV is significant in this study and seems to be associated with conditions such as pregnancy and CMV. Future studies will be important for better understanding of a false positive result on a screening test for HIV, with the aim of these tests will optimize and reduce the effects underlying such a result.

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	v
Abreviaturas	vii
I. Introdução.....	1
II. Revisão de literatura	3
1. <i>Epidemiologia do VIH</i>	3
2. <i>O vírus da imunodeficiência humana (VIH)</i>	3
2.1 Estrutura do VIH	3
2.2 Tipos de VIH.....	4
2.3 O ciclo de vida do VIH	6
2.4 Fases da progressão do VIH.....	8
2.5 Sintomas do VIH resultantes de várias etiologias	9
3. <i>Transmissão do VIH</i>	10
4. <i>Testes de rastreio para o VIH</i>	12
4.1 EIA, Western blot e ensaio de imunofluorescência para deteção de VIH	12
4.2 Ensaio de sensibilidade reduzida “detuned”	14
4.3 Testes de diagnóstico utilizando urina	14
4.4 Deteção do antígeno p24.....	15
4.5 Ensaio baseado na análise dos ácidos nucleicos do VIH	15
4.6 Cultura de células mononucleares do sangue periférico	16
4.7 Falsos positivos nos testes de deteção do VIH.....	16
III. Objetivos	19
IV. Materiais e métodos	21
4. <i>Caraterização da população em estudo</i>	21
4.1 Testes screening e confirmatório	21
4.2 Caraterização dos resultados falsos positivos no teste de rastreio para o VIH	24
V- Resultados	25
5. <i>Caracterização da população em estudo</i>	25

5.1	Análise dos dados demográficos da população em estudo	25
5.2	Distribuição da população em estudo com base no resultado obtido pelo teste de rastreio para o VIH	26
6.	<i>Caraterização da população para a qual de obteve um resultado falso positivo no teste de rastreio para o HIV</i>	27
6.1	Análise dos dados demográficos	27
6.2	Análise de dados clínicos, antecedentes medicamentosos e parâmetros laboratoriais	29
VI.	Discussão	35
VII.	Conclusão	43
VIII.	Bibliografia	45

Índice de Figuras

Figura 1- Estrutura do VIH [13].....	4
Figura 2 - Relações evolutivas entre as classes de VIH-1 não recombinantes [14].....	5
Figura 3 – Ciclo de vida do VIH (adaptado de [25]).....	7
Figura 4 -Teste de Tira do INNO-LIA TM VIH I/II Score	22
Figura 5 Distribuição do número total de indivíduos que realizaram o teste de rastreio para o VIH por sexo. (Dados referentes a 2010-2011).....	25
Figura 6 Distribuição do número total de doentes com resultado falso positivo no teste de rastreio pelo VIH por sexo (Dados referentes a 2010-2011).....	27
Figura 7 Distribuição do número total de doentes com resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH por faixa etária. (Dados referentes a 2010-2011)	28
Figura 8 Análise da relação da faixa etária com o género relativo aos indivíduos com resultado falso positivo no teste de rastreio pelo VIH. (Dados referentes a 2010-2011).....	28

Índice de Tabelas

Tabela 1 Intensidade da linha de reação do antígeno e seu significado	23
Tabela 2 Distribuição etária dos indivíduos que realizaram o teste de rastreio do VIH	26
Tabela 3 Resultados obtidos nos testes de rastreio para o VIH.....	26
Tabela 4 Distribuição dos doentes com resultado no teste VIH falso positivo pelos serviços onde foi requisitado o teste VIH. (Dados referentes a 2010-2011).....	29
Tabela 5: Diagnóstico efetuado pelo médico na data do pedido do teste de rastreio para o VIH	30
Tabela 6: Distribuição dos indivíduos em estudo pelos antecedentes pessoais	30
Tabela 7: Distribuição dos indivíduos pelo tipo de medicamentos que tomam de forma crónica ...	31
Tabela 8: Distribuição dos indivíduos com resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH de acordo com os parâmetros laboratoriais que se encontram alterados.....	32
Tabela 9: Distribuição do número total de grávidas consoante o resultado obtido no teste de rastreio para o VIH.....	33
Tabela 10: Distribuição da população em estudo com base no resultado do teste do Citomegalovirus IgG e IgM	34

Abreviaturas

TARV	Terapêutica anti- retrovítica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CDC	Centro de Controlo de Doenças e Prevenção
DST	Doença sexualmente transmissível
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELFA	Ensaio imunoenzimático ligado a fluorescência
FDA	Administração de alimentos e medicamentos
TARVAA	Terapêutica anti- retrovítica altamente ativa
VIH	Vírus de Imunodeficiência humana
HSV- 8	Herpes simplex vírus
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
mARN	Ácido ribonucleico mensageiro
mm ³	Milímetro cúbico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ARN	Ácido ribonucleico
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
UNAIDS	Programa das Nações Unidas sobre o VIH/SIDA
Ag/Ac	Antigénio/ Anticorpo
ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
γ – GT	Gama-glutamyltransferase

VS	Velocidade de sedimentação
LDH	Lactato desidrogenase
SAM	Sistema de Apoio aos Médicos
CMV	Citomegalovírus
HLA	Antigénio leucocitário humano

I. Introdução

O número de indivíduos que vivem com o VIH tem vindo a aumentar em todo o mundo, verificando-se em 2008, 33,4 milhões de pessoas infetadas, 20% mais casos do que os registados em 2000 e aproximadamente três vezes mais do que em 1990 [1, 2].

O VIH é um retrovírus ARN transmitido principalmente por via sexual, parental e transplacentária [3, 4]. Para o diagnóstico e confirmação de infeção pelo VIH os principais testes utilizados são: o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o Western blot. O método de ELISA tem sido utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-VIH 1 / 2 para fins de rastreio. O Western blotting é uma técnica que usa anticorpos específicos para a deteção de proteínas desnaturadas específicas do VIH, mais precisamente proteínas do *core-gag* (p17, p24 e p55), da polimerase-*pol* (p31,p51,p66) e do envelope-*env* (gp 41, gp120, gp 160). Ambos os testes têm uma elevada especificidade e sensibilidade, contudo o número de falsos positivos associados a estes testes são significativos [5] e têm sido relacionados com vários fatores, incluindo doenças auto-imunes, insuficiência renal, fibrose cística, gravidez, transfusões, doença hepática, hemodiálise e vacinação para hepatite B, raiva ou gripe, o que dificulta o diagnóstico [6, 7]. Assim, a compreensão das características de cada indivíduo para o qual se obteve um resultado falso positivo nos testes de rastreio para o VIH é fundamental não só para a interpretação cuidadosa dos resultados obtidos, como também para a pesquisa de métodos de diagnóstico alternativos aos existentes de forma a minimizar a ocorrência de falsos positivos e as consequências clínicas que daí possam advir.

O presente estudo pretendeu estabelecer uma relação entre as características de cada indivíduo que obteve um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH, dando particular ênfase aos métodos de diagnóstico em uso atualmente, às suas limitações e aos fatores subjacentes à ocorrência de falsos positivos.

II. Revisão de literatura

1. Epidemiologia do VIH

A nível mundial, estima-se que 33.4 milhões de indivíduos encontravam-se infetados pelo VIH em 2008 [1]. Uma análise do Centro de Controlo de Doenças e Prevenção (*Centers for Disease Control and Prevention*) revela que até ao final de 2006, mais de um milhão de habitantes, adultos e adolescentes foram infetados pelo VIH nos Estados Unidos. Na Finlândia até ao final de 2007, tinham sido relatados 2258 casos de infeção por VIH. Em África, cerca de 40% das novas infeções, aparecem em jovens com idades compreendidas entre os 15 e 24 anos [8]. Em Portugal, o primeiro caso de VIH foi detetado em 1983, no Hospital Curry Cabral. Num dos estudos do programa das Nações Unidas sobre o VIH/SIDA (UNAIDS), verificou-se que cerca de 42.000 pessoas estão infetadas pelo VIH em Portugal, correspondendo a cerca de 0,4% da população. Relativamente à ocorrência de novos casos da infeção, Portugal é o país com as maiores taxas da Europa. Noutro estudo observou-se que a 31 de Dezembro de 2010, encontravam-se notificados 39 347 casos de infeção VIH/SIDA nos diferentes estádios da infeção, bem como, o total de casos acumulados de SIDA era de 16 370, dos quais 513 causados pelo vírus VIH-2, 212 casos referem infeção associada aos vírus VIH-1 e VIH-2 e os restantes casos causados pelos vírus VIH-1. Desde 1999 têm surgido mais casos de SIDA em grupos etários superiores (> 45 anos)[9].

2. O vírus da imunodeficiência humana (VIH)

2.1 Estrutura do VIH

O VIH (Figura 1) possui uma cápside composta por proteínas, glicoproteínas, ácidos gordos e ácidos ribonucleicos (ARN) que transportam o material genético do VIH. Cada partícula viral do VIH é encapsulada no envelope viral que é derivado da

membrana celular da célula humana hospedeira. Dentro do envelope viral encontra-se o nucleocapsídeo ou o núcleo viral. A camada externa deste núcleo é composta por uma proteína designada de p17, enquanto o núcleo interno é composto por proteínas p24 [10-12].

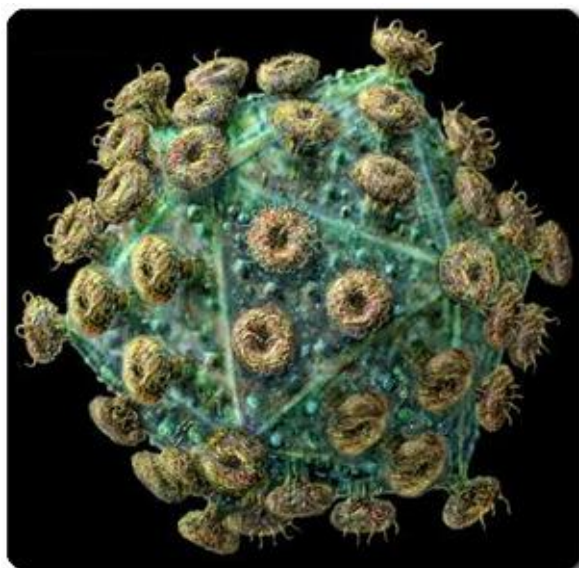


Figura 1- Estrutura do VIH [13].

O núcleo da partícula viral detém o genoma do VIH, que é composto por duas moléculas de ARN de cadeia simples. Estas moléculas estão associadas a proteínas necessárias para a sobrevivência e propagação do VIH, incluindo uma transcriptase reversa, que converte o ARN do VIH em ADN, e uma integrase, que integra o ADN do VIH no genoma da célula hospedeira. Estas proteínas, juntamente com as glicoproteínas acima referidas, são muitas vezes referidas como antígenos (por exemplo, o antígeno p24) porque podem evocar uma resposta imune do hospedeiro infetado [10].

2.2 Tipos de VIH

O VIH pertence a uma classe de vírus designada de retrovírus, e a um subgrupo de retrovírus conhecido como lentivírus [14]. Dois tipos virais geneticamente distintos de VIH, o VIH-1 e o VIH-2 foram identificados [14].

O VIH-1 é o tipo viral mais comum, encontrado nos Estados Unidos, Europa e África Central. Este caracteriza-se pela ampla heterogeneidade genética impulsionada

por vários fatores, tais como, a inatividade da transcriptase reversa (RT), o rápido *turnover* do VIH-1 *in vivo*, a sensibilidade a pressões seletivas do sistema imunitário e a sua capacidade de recombinação durante a replicação. Devido a esta variabilidade, as variantes do VIH-1 são classificadas em três grupos filogenéticos: grupo M (principal), grupo O (*outlier*) e grupo N (não-M/não-O) [15]. O grupo M é responsável pela maioria das infeções do VIH-1, podendo ser subdividido em 10 subtipos filogenéticos (A a K), que são aproximadamente equidistantes entre si (Figura 2) [16-18]. A variabilidade genética entre os subtipos do grupo M é de 15% para o gene *gag* e 25% para o gene *env* [19].

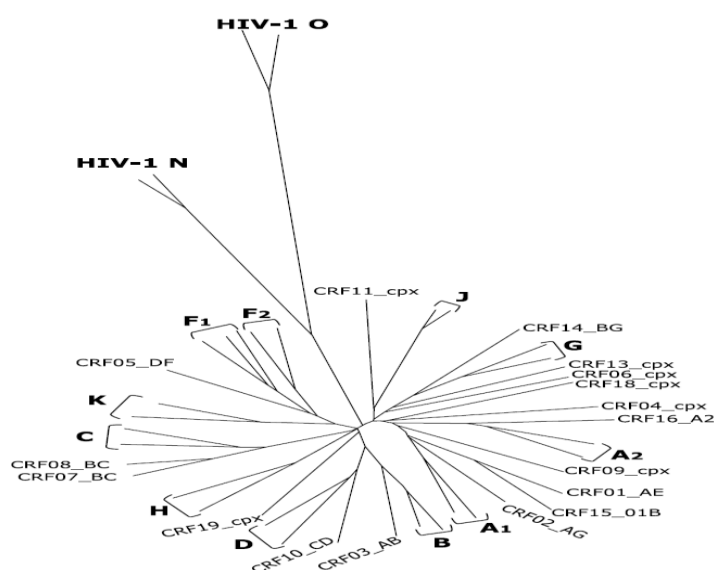


Figura 2 - Relações evolutivas entre as classes de VIH-1 não recombinantes [14].

Adicionalmente, dentro de um subtipo é possível identificar subsubtipos, que são filogeneticamente mais estreitamente relacionadas entre si do que para outros subtipos. Este é o caso dos subtipos A e F, cujos membros são classificados atualmente em subsubtipos, A1, A2 e F1, F2, respetivamente. Também se verifica o mesmo relacionamento para os subtipos B e D, sendo o subtipo D considerado o início da variante africana do subtipo B, contudo a sua designação original como subtipo é mantido pelos autores, para consistência com trabalhos anteriormente publicados [14].

A classificação dos subtipos de VIH-1 foi originalmente baseada nas regiões subgenómicas de genes individuais. No entanto, o elevado número de subtipos disponíveis em todo o mundo e o progresso nos métodos de sequenciamento, levaram a que atualmente as classificações filogenéticas do VIH-1 sejam baseadas em sequências

de nucleótidos provenientes de várias regiões subgenómicas (*gag*, *pol* e *env*) dos mesmos subtipos ou na sequência do genoma completo em análise. Esta abordagem revela que as relações filogenéticas entre os diferentes subtipos variam ao longo dos seus genomas [18].

O VIH-2 também apresenta variabilidade genética significativa, uma vez que os oito grandes *clusters* filogenéticos de VIH-2 resultaram de eventos de transmissão entre espécies diferentes. O sistema de classificação define como grupos: A a H, onde os mais frequentemente observados são os grupos A e B e as estirpes mais raras são os grupos C e H. Este tipo de VIH é principalmente encontrado em indivíduos infetados na África Ocidental [18, 20].

2.3 O ciclo de vida do VIH

O curso de infeção por este tipo de vírus é caracterizado por um intervalo de tempo entre a infeção inicial e o aparecimento de sintomas graves. Como todos os vírus, o VIH pode replicar apenas dentro das células [21]. Uma vez dentro da célula, o VIH e outros retrovírus usam a enzima transcriptase reversa para converter o seu ARN em ADN, que por sua vez pode ser incorporado nos genes da célula humana [22]. Na primeira etapa da replicação viral (Figura 3) ocorre a ligação da partícula viral a recetores específicos na superfície da célula alvo. A entrada ocorre através da fusão do vírus com a membrana da célula, sendo essa reação mediada pela gp 41, onde ocorre a ligação da proteína gp120 ao recetor CD4, expresso na superfície de linfócitos T e macrófagos [23]. Após a ligação da gp120 a um desses recetores de quimiocinas, ocorre uma alteração estrutural da gp120 expondo a gp41, que irá resultar na fusão da membrana celular com o envelope viral. Uma vez dentro do citoplasma da célula, a transcriptase reversa de VIH converte o ARN viral em ADN, sendo feito uma cópia completa. A cópia de ADN é transportada para o núcleo celular onde uma segunda proteína, a integrase, vai catalisar a integração do ADN viral no material genético do hospedeiro [22, 24].

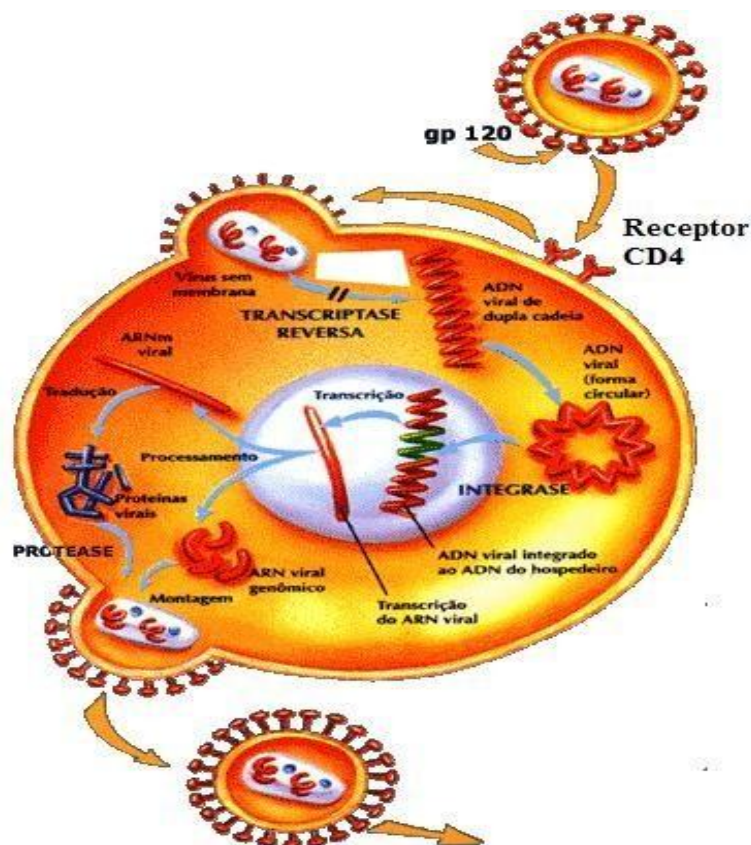


Figura 3 – Ciclo de vida do VIH (adaptado de [25]).

Um dos principais fatores que interferem na progressão da doença é a ativação anormal da resposta imune, que cria agregados de linfócitos T $CD4^+$ ativados tornando-se assim alvos do VIH, levando a um comprometimento do sistema imunitário[22]. Se a célula $CD4^+$ não está ativada [26], é possível que o vírus persista numa fase latente durante muitos anos [24].

A capacidade do vírus em manter-se latente nas células infetadas torna difícil a erradicação do VIH. Por esta razão, os doentes VIH- positivos devem permanecer com terapêutica anti- retroviral indefinidamente. A expressão subsequente dos genes virais resulta da transcrição do ARN a partir do ADN do VIH e na tradução de proteínas virais. O ARN transcrito de ADN (mARN) é transportado do núcleo da célula para o citoplasma. Uma vez no citoplasma, há síntese proteica e ocorre uma quebra da cadeia polipeptídica por ação da protease, dando origem às diferentes proteínas virais, usando o mARN do VIH como modelo. A protease do VIH é altamente específica para o VIH e é alvo de uma classe de fármacos usada no seu tratamento [22, 24].

2.4 Fases da progressão do VIH

No processo de infeção do VIH existem três fases. A primeira fase é denominada de fase aguda, que ocorre imediatamente após a infeção pelo VIH, manifestando-se nos doentes através de sintomas gripais e erupção cutânea [27, 28]. Esta fase inicial da infeção pelo VIH, é seguida por uma deterioração progressiva da função imune, pois o vírus tem a capacidade de infetar os linfócitos T CD4⁺, bem como outras células do organismos, incluindo os monócitos e tímócitos [27].

O vírus entra na célula alvo através de moléculas da superfície celular, incluindo o CD4 e os co-receptores de quimiocinas (CXCR4, CCR5). Os linfócitos T CD4⁺, também designados de "células T-helper", desempenham um papel central na resposta imune, procedendo à sinalização celular. Normalmente, uma pessoa saudável tem uma contagem de 800 a 1200 linfócitos T CD4⁺ por milímetro cúbico (mm³) de sangue [27]. Como os linfócitos T CD4⁺ são destruídas pelo VIH, verifica-se uma diminuição de cerca de 500 mm³, levando a que o sistema imune fique debilitado, o que resulta no aparecimento de infeções secundárias, tais como, herpes labial (herpes simplex), condilomas (verrugas), infeções fúngicas, aftas e candidíase vaginal [27]. Nesta fase, o ácido nucleico viral e o antígeno p24 do VIH são detetáveis no soro do doente, no entanto não são detetados os anticorpos de VIH (seronegativos). Durante a fase aguda da infeção, após cerca de 6 semanas, os níveis de ARN de VIH no sangue atingem o máximo, seguindo-se uma diminuição dos seus níveis [29]. Por sua vez, a contagem de linfócitos T CD4⁺ cai rapidamente, seguido de um aumento ligeiro [27].

Os anticorpos anti- VIH são geralmente detetados no soro do hospedeiro cerca de 6-8 semanas após a infeção. A deteção de anticorpos do hospedeiro é conhecida como seroconversão e marca o início da segunda fase da infeção pelo VIH designada como fase crónica [30]. Durante esta fase, a resposta dos anticorpos do hospedeiro ao VIH evolui e amadurece, resultando num aumento de anticorpos ao longo de vários anos. Adicionalmente, os níveis de ARN do VIH no sangue permanecem relativamente estáveis, e a contagem de linfócitos T CD4⁺ do hospedeiro começa a diminuir [27].

Geralmente quando os valores dos linfócitos T CD4⁺ são inferiores a 200 mm³ (considerando o limite para as nossas defesas), verifica-se o aparecimento de doenças, sobretudo oportunistas, estabelecendo-se um quadro de SIDA que se traduz por efeitos diretos do vírus, tais como, caquexia (emagrecimento como lipoatrofia sobretudo a nível da região subcutânea), febre, fraqueza e lesões neurológicas, uma vez que as células

gliais são células-alvo que possuem receptores para linfócitos T CD4⁺ em número suficiente para causar demência a longo prazo. Também se verifica uma imunodepressão, que se traduz por infecções múltiplas, infecções oportunistas e neoplasias, por expressão dos oncogenes que o próprio vírus tem, como por exemplo o sarcoma de Kaposi (por desenvolvimento do HMV-8), o linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt e outras neoplasias mais frequentes nos doentes infectados por este vírus [27, 31, 32].

2.5 Sintomas do VIH resultantes de várias etiologias

Os sintomas podem ser descritos em termos da sua intensidade, duração, interferência com as atividades diárias e grau de mudança ao longo do tempo. Embora o VIH possa causar sintomas gripais, adinofagia, fraqueza ou prurido, estes geralmente aparecem apenas duas a seis semanas após a infeção e tendem a resolver-se numa a duas semanas, uma vez que o sistema imunitário começa a produzir anticorpos para o VIH. Após este período de "infeção primária pelo VIH", o vírus permanece no organismo, mas é em grande parte assintomático [33, 34].

Mais tarde, se a terapêutica não for eficaz, a progressão da doença associada ao aumento da carga viral e da diminuição do número de linfócitos T CD4⁺ na circulação sanguínea, resulta no aparecimento de sintomas. O comprometimento do sistema imunológico resulta em perda de peso, fraqueza, febre, problemas nutricionais, e diarreia [33]. Como o sistema imunológico enfraquece progressivamente, as pessoas infectadas pelo VIH tornam-se mais vulneráveis a infecções oportunistas que normalmente não causam doença em indivíduos que não estão imunocomprometidos. As infecções oportunistas podem resultar em diversos sintomas como queixas a nível orofaríngeo, genital, problemas de digestão, dor neuropática, mialgias, problemas respiratórios, problemas de visão ou perturbação cognitiva. Estes sintomas podem aparecer em simultâneo o que dificulta o quadro clínico [33].

O estado mais avançado da infeção pelo VIH, também é conhecido como o síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), sendo definido por uma contagem de linfócitos T CD4⁺ inferior a um determinado nível (< 200 células/mm³) ou a presença de uma ou mais doenças oportunistas [33]. Os indivíduos infectados com o vírus podem ter sintomas que advêm de outras fontes, tal como o envelhecimento, em que se observa

demência, debilidade física, diabetes, doenças cardiovasculares, artrite, asma, complicações genito-urinário e cefaleias [33, 35]. A toxicidade dos fármacos é uma questão a ser tida em consideração em todos os tratamentos do VIH, sendo mais provável de ocorrer entre os indivíduos mais velhos. Os efeitos secundários que provêm da terapêutica antiretroviral da infeção do VIH são a osteoporose e lipodistrofia [36], que envolve uma redistribuição de gordura da face e das extremidades do abdómen e costas, um aumento do colesterol total, um aumento de triglicerídeos e uma diminuição da tolerância á glucose [33, 37].

Adicionalmente, o stress psicossocial é muito comum na infeção pelo VIH e pode ser grave, incluindo ansiedade sobre os resultados da possível doença, perturbações nas relações interpessoais, experiência do estigma, discriminação evidente ou violência [33]. Estes fatores comuns de stress e depressão podem agravar os sintomas físicos existentes, e resultar em queixas somáticas, bem como interferir no tratamento [38-40].

3. Transmissão do VIH

Os fatores de risco associados à transmissão do VIH são essencialmente: a atividade sexual (homo-, bi- e heterossexual) [4], contato com produtos sanguíneos [41], partilha de seringas [42] e transmissão transplacentária [43].

A análise da situação global em Portugal a 31 de Dezembro de 2010 evidenciou que o maior número de casos de VIH estava associado a transmissão sexual (heterossexual) num total de 42,1% dos casos, enquanto a partilha de seringas constituía 39,9% de todas as notificações, alterando-se assim, a tendência inicial da epidemia do país. Em relação aos casos de SIDA, em 2010, houve um aumento proporcional do número de casos de transmissão heterossexual (59,4%) e menor número de casos associados à toxicodependência. Quanto aos portadores assintomáticos da infeção em Portugal, são predominantemente indivíduos com idades compreendidas entre os 20 - 39 anos (68,5%), constatando-se que este elevado número de casos estavam associados a duas categorias de transmissão: heterossexuais (45.7%), bem como toxicodependentes (36,4%) [9].

Durante o contato sexual, o vírus pode atravessar a barreira mucosa da vagina, vulva, pénis e reto para entrar em contacto com células imunes (dendríticas) que transportam o vírus através da mucosa [4, 44]. As células dendríticas captam o vírus no

exterior, atravessam para o interior e libertam o vírus infeccioso nos tecidos linfáticos. O vírus liga-se a um linfócito T CD4⁺, tendo como alvo o tecido linfático, e assim começa o primeiro ciclo de infecção [44].

O risco de infecção aumenta durante a relação sexual quando um parceiro tem uma carga viral elevada, como se verifica na infecção primária e novamente no estágio final de doença [4]. Nas mulheres é mais provável adquirir o VIH durante uma relação heterossexual do que os homens, devido às características fisiológicas femininas, tais como a grande área de superfície da mucosa que fica exposta ao líquido seminal [45].

O risco de transmissão do VIH durante o sexo anal recetivo é cerca de 10 vezes superior ao do sexo vaginal [46]. Quando usado o preservativo de modo regular e correto, principalmente quando se trata de um indivíduo seropositivo e outro não infetado, o risco de transmissão heterossexual é extremamente baixo [45, 47]. A Organização Mundial de Saúde recomenda ainda a realização da circuncisão masculina como uma intervenção adicional importante para reduzir o risco de adquirir a infecção pelo VIH em relações heterossexuais [47].

Outro meio de transmissão do VIH ocorre pelo contato com sangue infetado, geralmente através da reutilização ou partilha de seringas e agulhas com drogas, risco que no entanto diminuiu pela introdução de programas de troca de agulhas [48].

Nos EUA, Canadá e Europa, o fornecimento de sangue tem sido rastreado para o VIH desde 1985, e o risco de infecção a partir de produtos derivados de sangue neste momento é remoto [48].

Existe um risco de transmissão do VIH da mãe grávida para o feto ou recém-nascido durante a gravidez, pelo parto ou pelo aleitamento materno, contudo apenas um terço das crianças cujas mães estão infetadas adquirem a infecção [49, 50]. Neste sentido, a inclusão de intervenções ideais como a TARV e cesariana, têm reduzido a taxa de transmissão materno-infantil do VIH-1 de cerca de 25% para 1% a 2% em países desenvolvidos. O risco geral de transmissão em crianças com 18 a 24 meses de idade é nestes países de cerca de 15% a 25%. Em 700.000 crianças infetadas com o VIH em 2003, cerca de 315.000 foram infetados através da amamentação [49].

A avaliação do nível e a frequência dos comportamentos de risco relacionados com a transmissão do VIH são importantes na identificação das populações com maior risco. Muitos programas de prevenção concentram-se em informar as pessoas sobre a transmissão sexual de VIH, na esperança de superar alguns dos equívocos que possam levar a que não haja uma mudança de comportamento relativamente a práticas mais

seguras. A deteção precoce e o rastreio do VIH são imperativos para a sobrevivência a longo prazo dos doentes e na prevenção da transmissão aos parceiros sexuais ou relativamente à partilha de seringas [37].

4. Testes de rastreio para o VIH

Os testes de diagnóstico de VIH utilizados atualmente baseiam-se na deteção de anticorpos do hospedeiro contra as diferentes proteínas do VIH ou na deteção direta do vírus ou componentes do vírus como o antígeno p24 ou o ARN. O objetivo da maioria destes testes de diagnóstico é detetar a infeção pelo VIH tão cedo quanto possível, diminuindo assim o aumento da janela imunológica [51]. No entanto, certos testes de diagnóstico de VIH visam ainda distinguir entre infeções de VIH recentes e num estado avançado, realizados principalmente por razões epidemiológicas, para estimar a incidência do VIH dentro de uma determinada população [51].

Independentemente da finalidade dos testes de diagnóstico de VIH ou dos tipos de moléculas detetadas pelo teste, o sangue ou produtos derivados (plasma, soro ou manchas de sangue seco) constituem as amostras mais indicadas para análise. Adicionalmente, as amostras de sangue podem ser armazenadas por longos períodos de tempo e manter-se bastante estáveis. O plasma pode ser armazenado durante 10 anos a -20°C, já o soro pode ser armazenado por 4 a 7 anos a -70°C. O plasma permanece estável à temperatura ambiente entre 24 a 48 horas.[52].

Vários testes de diagnóstico do VIH têm sido desenvolvidos com o intuito de serem aplicados a outros fluídos biológicos como a saliva ou a urina, pois não requerem métodos invasivos para a sua colheita [53].

4.1 EIA, Western blot e ensaio de imunofluorescência para deteção de VIH

O imunoensaio enzimático (EIA) é o ensaio padrão usado para a deteção de anticorpos anti- VIH [54]. Os anticorpos detetados são principalmente do subtipo imunoglobulina G (IgG). Efetivamente, os ensaios que visam detetar anticorpos anti-VIH do subtipo imunoglobulina M (IgM) não são suficientemente sensíveis porque a

concentração no soro do IgM anti – VIH é geralmente baixa. Para efetuar um EIA indireto típico, o soro do doente (ou plasma) é incubado com um antígeno de VIH (geralmente p24, gp41 e/ou gp120). Nos doentes seropositivos em que há seroconversão o anticorpo e o antígeno ligam-se, sendo o anticorpo detetado mais tarde [55]. Para minimizar o risco de falsos positivos, os resultados positivos obtidos por EIA são ainda confirmados por Western blot [54, 56]. No Western blot, as proteínas de um lisado do VIH-1 são separadas de acordo com o tamanho, por eletroforese em gel de poliacrilamida e posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é então incubada com IgG conjugada com uma enzima, que na presença de um substrato causa mudança de cor [55].

O ensaio de imunofluorescência indireto também pode ser usado como um teste de confirmação. Neste ensaio, as amostras de soro ou plasma são incubadas com linfócitos T previamente infetados pelo VIH e que expressam antígenos VIH na superfície da célula. Paralelamente utilizam-se linfócitos T CD4⁺ não infetados como controlo. Se um indivíduo tem anticorpos contra antígenos VIH, os anticorpos devem ligar-se aos linfócitos T CD4⁺ infetados, mas não a células não infetadas utilizadas como controlo negativo. Os anticorpos ligados, em seguida, são detetados com um anticorpo anti-humano conjugado a uma molécula fluorescente como isotiocianato de fluoresceína. A molécula fluorescente emite luz quando exposta à radiação ultravioleta sendo a análise do sinal realizada por microscopia de imunofluorescência. O grau e o padrão de fluorescência determinam se uma amostra é infetada pelo VIH [54].

A utilização combinada dos testes de ELISA e Western blot constitui a abordagem mais usada para o diagnóstico do VIH. Mais ainda, quando esta combinação de testes é usada após a seroconversão apresenta uma elevada sensibilidade (ou uma baixa taxa de resultados falsos negativos) de 99,3 – 99,7% e uma elevada especificidade (ou uma baixa taxa de falsos positivos) de 99,7%. No entanto, os resultados falsos negativos aparecem muitas vezes se o teste for realizado entre o tempo de transmissão viral e de seroconversão. Mais ainda, os resultados falsos negativos são mais prováveis numa população com um elevado número de infeções pelo VIH (populações de alta prevalência). A maioria dos testes de diagnóstico de ELISA/Western blot tem-se focado na deteção do grupo M do VIH-1, infeções do subtipo b (o subtipo do VIH mais comum), não sendo tão sensíveis para a deteção do grupo O do VIH-1, ou infeções por VIH-2. Assim, a infeção pelo grupo O do VIH-1 ou VIH-2 pode muitas vezes produzir resultados falsos negativos. No entanto, vários estudos demonstraram que combinações

de EIAs ou testes rápidos podem facilitar a deteção e a diferenciação de VIH-1, VIH grupo O e VIH-2 com resultados fiáveis [55].

4.2 Ensaio de sensibilidade reduzida “detuned”

Enquanto o EIA e o Western blot podem determinar se uma pessoa está infetada com o VIH, este tipo de combinação não indica se a infeção é recente ou longa. Em contraste, o ensaio *detuned* é capaz de distinguir infeções por VIH recentes (infeção nos últimos 129 – 180 dias dependendo do teste) de infeções por VIH mais prolongadas [57].

Para tal, o ensaio *detuned* baseia-se no fato dos níveis de anticorpos anti-VIH no soro de seroconvertidos recentes serem inferiores aos níveis em seroconvertidos a longo prazo. Este requer uma maior concentração de anticorpos do soro anti-VIH do que no EIA para ter um resultado positivo. Como o *detuned* é capaz de detetar novas infeções, tem um valor particular do ponto de vista da saúde pública porque fornece uma estimativa da incidência da infeção pelo VIH numa dada população. Com essas informações, os médicos podem melhorar a prevenção do VIH através da identificação de populações com maior risco de contrair VIH, e apostar em programas de educação e prevenção [51].

4.3 Testes de diagnóstico utilizando urina

Os testes de diagnóstico de VIH utilizando a urina como amostra podem ser usados como ensaios de diagnóstico em alternativa ao padrão EIA. Tal como acontece com os testes sorológicos e salivares, o EIA é usado para detetar a presença de anticorpos anti-VIH na urina. Como o teste de urina é simplesmente um teste de rastreio, os resultados positivos requerem confirmação com o EIA e Western blot ao sangue [58].

Como acima referido, a utilização de urina e saliva para fins de diagnóstico apresenta a vantagem de requerer métodos de colheita de amostra não invasivos para o doente e de apresentar menos riscos biológicos do que a recolha de sangue. No entanto, ao contrário das amostras de sangue, as amostras de urina e saliva não podem ser usadas

em muito mais testes de diagnóstico, como os que fornecem informações adicionais sobre o curso de infecção VIH e as características específicas do subtipo do VIH responsável pela infecção, devido a sua baixa sensibilidade e especificidade [53].

4.4 Detecção do antígeno p24

Os testes de detecção do antígeno p24 quantificam o antígeno p24 livre do VIH numa amostra serológica usando EIA. Estes testes são bastante sensíveis quando comparado com os testes de ARN de VIH, apresentam uma sensibilidade que varia entre 10% a 95%, não sendo usados como o único indicador de diagnóstico de infecção por VIH. No entanto, os ensaios de detecção de antígeno p24 foram incorporados numa nova geração de ensaios, referidos como quarta geração de ensaios de rastreio. Estes ensaios detetam simultaneamente anticorpos anti-VIH, bem como o antígeno p24 do VIH, sendo mais sensíveis do que os testes que detetam só anticorpos [59].

O Vidas VIH DUO Ultra pertence à quarta geração de ensaios de rastreio, permitindo reduzir o intervalo de tempo entre o contato com a infecção e o diagnóstico da infecção [60]. Este permite a detecção de imunoglobulinas totais anti-VIH-1 (grupo O e M), anti-VIH-2 e do antígeno p24 do VIH-1 no soro ou no plasma humano pela técnica de ELFA (ensaio imunoenzimático ligado a fluorescência) [61]. Com esta abordagem é possível uma detecção precoce da infecção pelo VIH [51, 62, 63].

4.5 Ensaios baseados na análise dos ácidos nucleicos do VIH

Existem atualmente duas técnicas básicas usadas para amplificar ou aumentar o número de cópias do ARN do VIH, com o intuito de quantificar e sequenciar o genoma. A primeira técnica envolve a transcrição reversa seguida por RT-PCR, e na segunda o ARN do VIH capturado é quantificado por hibridização [62].

Os ensaios de RT-PCR baseados na conversão de ARN do VIH em DNA utilizam a transcriptase reversa, seguindo-se a amplificação do DNA por PCR, verificando-se um aumento do número de cópias de DNA o que possibilita assim uma melhor detecção [55, 64, 65]

Estes testes são utilizados em indivíduos com infecção pelo VIH confirmada, com o intuito de determinar o número de cópias de ARN virais no plasma do doente, para

assim avaliar a carga viral. A carga viral é usada como uma ferramenta de prognóstico, pois monitoriza a progressão da infeção e avalia a resposta do doente à TARV [66, 67]. Este tipo de teste fornece informações sobre o subtipo do VIH que causa a infeção e indica se a estirpe do VIH é resistente ao tratamento farmacológico [62, 68].

4.6 Cultura de células mononucleares do sangue periférico

Neste teste de diagnóstico do VIH, um subconjunto de células do sangue do doente (as células mononucleares) são cultivadas num ambiente controlado durante 28 dias para posterior isolamento do VIH das células. Este procedimento é usado para detetar qualitativamente o VIH em crianças, e quantitativamente para determinar o estadio do doente com infeção, desde que os níveis de VIH nas células se correlacionem com a fase de infeção [69]. No entanto, esta técnica é muito dispendiosa em relação aos padrões de anticorpos de VIH requeridos, o que leva a que seja usada principalmente para acompanhamento terapêutico dos doentes em ensaios clínicos, que não detetam o vírus por ensaios quantitativos de ARN do VIH [70].

4.7 Falsos positivos nos testes de rastreio para o VIH

Os testes de rastreio para o VIH têm uma elevada importância devido a natureza epidémica do VIH, à alta mortalidade da doença, mas também pelo impacto psicológico do resultado do próprio teste. Várias estratégias de diagnóstico e vigilância foram propostas pelo programa das Nações Unidas sobre o VIH/SIDA (UNAIDS) e outras organizações, baseando-se na utilização de ensaios de primeira linha, geralmente testes de rastreio de anticorpos anti-VIH e testes de confirmação no caso de um resultado positivo ou indeterminado usando o Western blot ou immunoblot. Assim, indivíduos recentemente diagnosticados com VIH seropositivos, relativamente à análise da sua primeira amostra, procedem à confirmação utilizando uma segunda amostra. Em França, a deteção de anticorpos anti-VIH depende da utilização de dois ensaios diferentes em cada amostra. Quando ambos os testes são negativos, conclui-se a ausência de anticorpos anti-VIH. Se ambos os testes forem positivos ou discordantes, ou

seja, não-reativo/reativo, é necessário efectuar um Western blot para confirmar a especificidade de anticorpos anti- VIH, pelo que os testes confirmatórios deverão ser positivos para confirmação da presença de anticorpos anti- VIH [71].

Em indivíduos adultos, os testes de rastreio para o VIH podem ser discordantes por três motivos. Em primeiro lugar, pode-se observar um teste discordante na presença de uma infeção recente pelo VIH, mas se se realizar testes numa segunda amostra passados três meses após a realização do primeiro teste, verifica-se que ambos os testes são positivos. Em segundo lugar, algumas variantes específicas do VIH-1 e VIH-2 podem não ser detetadas por alguns anticorpos anti-VIH, o que dá resultados indeterminados no Western blot. Em terceiro lugar, pode não estar relacionado a uma infeção pelo VIH, o que é um resultado falso positivo [71],

Os resultados falso-positivos têm sido associados a várias condições, incluindo doenças auto-imunes, insuficiência renal, fibrose cística, gravidez, transfusões, doença hepática, hemodiálise e vacinação para hepatite B, raiva ou gripe [6, 72-74]. Adicionalmente, este tipo de resultados obtidos por ELISA podem ser vistos temporariamente em participantes de ensaios preventivos da vacina do VIH, pois podem desenvolver anticorpos relacionadas com o VIH, mas não estarem infetados [75].

Têm sido sugeridas várias causas para os resultados falsos positivos, tais como: os aloanticorpos resultantes da gravidez, transfusão e transplante; a uma reação cruzada de anticorpos com peptídeos específicos de VIH-1 ou antígenos recombinantes quando se trata de uma pessoa saudável. Contudo falta apurar se esta reatividade é devida à exposição a proteínas virais semelhantes [75]. Também os anticorpos heterófilos são uma causa reconhecida de interferência em imunoensaios, sendo caracterizados por reagirem com diferentes epítomos. Visto este tipo de anticorpos poderem estar presentes em 40% dos indivíduos, especialmente em doentes que realizem imunoterapia com anticorpos monoclonais, podem ser uma causa possível para a ocorrência de falsos positivos. Porém, a reação dos anticorpos heterófilos com outras moléculas usadas em imunoensaios, não está bem caracterizada [76].

Como uma abordagem alternativa para resolver estes problemas do ponto de vista técnico, propõe-se a utilização da quarta geração de ensaios de rastreio, reduzindo assim o número de resultados falso-positivos como Taegtmeyer *et al* [77] já tinham sugerido. Também se testou este tipo de ensaios numa população de mulheres grávidas, verificando-se que a especificidade do teste melhorou de 99,6% para 100% e o valor

preditivo positivo foi melhorado de 93,7% para 100%, em comparação com o protocolo padrão [73].

As mulheres grávidas são sujeitas a um rastreio para a identificação do VIH pois ajuda a planear o parto e a evitar a transmissão através da amamentação. Os testes de rastreio recomendados pela FDA são ensaios imunoenzimáticos que tem uma especificidade e sensibilidade elevada [6, 78, 79]. Quando são notificadas de um resultado positivo, o seu estado emocional é comprometido, verificando-se ansiedade e depressão, enquanto aguardam os resultados dos testes de confirmação. Em casos extremos chegam a considerar o aborto como opção [73]. Contudo, ainda não é tido como claro que, o fato de uma mulher estar grávida seja o motivo para o resultado do teste de rastreio para o VIH ser um falso positivo [6].

Assim, os clínicos devem estar cientes dos diferentes testes disponíveis para o diagnóstico da infeção pelo VIH. Assim, ao escolher um teste rastreio para o VIH, deve-se ter em consideração a sensibilidade, a especificidade, o custo do teste, a prevalência do VIH na comunidade, os resultados do teste, assim como fatores de risco associados ao indivíduo que está a ser testado [75].

III. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo analisar os resultados falsos positivos obtidos no teste de rastreio para o VIH efetuado no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E – Aveiro, no período compreendido entre 1 de janeiro de 2010 a 31 de dezembro de 2011.

Para alcançar o objetivo proposto realizou-se um estudo retrospectivo, que pretendeu caraterizar epidemiologicamente a população que realizou o teste de rastreio para o VIH, bem como identificar os falsos positivos nessa mesma população.

Este trabalho pretendeu ainda estudar mais pormenorizadamente a população para a qual se obteve um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH. Para tal, procedeu-se a recolha de dados demográficos (género e faixa etária) e clínicos (diagnóstico aquando a realização do teste de rastreio para o VIH), os antecedentes pessoais (diagnósticos /problemas), potenciais fatores de risco (transfusões e hemodiálise) e parâmetros laboratoriais (hemoglobina, linfócitos, plaquetas, tempo de protombina, velocidade de sedimentação, aspartato transaminase, alanina transaminase, gama-glutamyltransferase, lactato desidrogenase, sódio, cloro, potássio, cálcio, magnésio, ferritina e ferro) obtidos aquando da realização do teste de rastreio para o VIH. Por conseguinte, pretendeu-se relacionar os parâmetros recolhidos de cada indivíduo que obteve um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH, possibilitando assim uma melhor compreensão dos fatores biológicos e metodológicos subjacentes.

IV. Materiais e métodos

4. Caraterização da população em estudo

No sentido de compreender a relação das características de cada indivíduo para o qual se obteve um resultado falso positivo no teste de rastreio para o HIV, de forma a minimizar a ocorrência de falsos positivos e as consequências clínicas que daí possam advir, realizou-se um estudo observacional, descritivo e retrospectivo. Para tal, foram analisados os dados obtidos pelo sistema informático (Appolo) do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E – Aveiro de todos os indivíduos que realizaram o teste de rastreio à infeção pelo VIH, no período compreendido entre 1 de Janeiro de 2010 e 31 Dezembro de 2011. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E – Aveiro.

Entre 1 de janeiro de 2010 e 31 de Dezembro de 2011 foram realizados 6981 testes de rastreio para o VIH, para um total de 6302 indivíduos. Para efeito, consultaram-se os processos clínicos de cada indivíduo e avaliaram-se as seguintes variáveis: o resultado do teste de rastreio do VIH, o número médio de testes de VIH por indivíduo, os dados demográficos, clínicos e os parâmetros laboratoriais. Após a análise das variáveis pretendidas, dividiu-se a população de acordo com o resultado do teste de rastreio para o VIH (negativo, positivo, indeterminado e falso positivo).

4.1 Testes de *screening* e confirmatório

Os métodos usados para análise de VIH das amostras de soro foram a quimioluminescência, através do imunoensaio ADVIA Centaur XP[®] (Siemens, Irlanda), a ELFA (Ensaio Imunoenzimático ligado a Fluorescência) usando o sistema mini VIDAS DUO (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) e o teste confirmatório INNO-LIA[™] VIH I/II Score (INNOGENETICS N:V, Belgium):

Para a análise por quimioluminescência, o primeiro teste de “*screening*”, procedeu-se à análise em duplicado da amostra pelo ensaio ADVIA Centaur combinado de Ag/Ac do VIH. Este método é um imunoensaio de diagnóstico *in vitro* que permite a deteção qualitativa simultânea do antígeno p24 do vírus e dos anticorpos dos vírus do tipo 1 (incluindo o grupo O) e tipo 2, no soro e no plasma. Se as amostras tiverem um valor de índice (*cut off*) inferior a 1, são consideradas negativas para os anticorpos anti-VIH-1 e 2 e para o antígeno p24, caso o *cut off* seja igual ou superior a 1, são consideradas positivas para o antígeno p24 e /ou anticorpos do VIH-1 e VIH-2 e devem ser novamente testadas, em duplicado, após centrifugação.

Como segundo teste de “*screening*”, realizou-se a análise das amostras, em duplicado, pelo método de ELFA. Este método baseia-se na deteção do anticorpo do VIH-1 gp 160, do anticorpo do VIH-2 gp 36 e do antígeno p24. Quando o seu cut-off é inferior a 0,25, obtém-se um resultado negativo, por sua vez se a amostra for igual ou superior a 0,25 verifica-se um resultado positivo [60].

Para confirmar a presença de anticorpos contra o VIH-1, incluindo o grupo O, e de tipo 2 em plasma ou soro humana realizou-se um teste confirmatório. O teste confirmatório usado foi o imunoensaio INNO-LIA, que permite diferenciar entre infeção VIH-1 e VIH-2.

A figura 4 representa a identidade e a localização dos antígenos e controlos impregnados na tira.

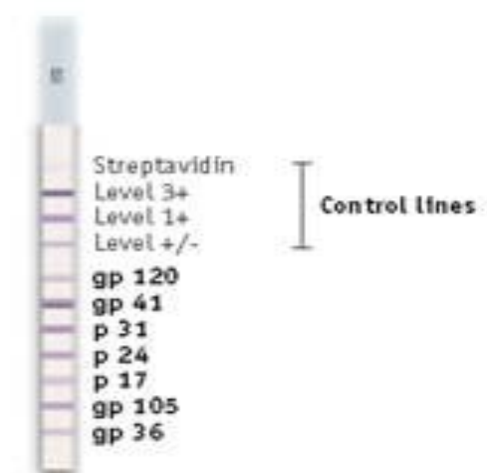


Figura 4 -Teste de Tira do INNO-LIATM VIH I/II Score

A intensidade da reação nas linhas de controlo de cada tira é utilizada para estabelecer índices de reatividade para cada antígeno naquela tira, como se pode verificar na Tabela 1.

Tabela 1 Intensidade da linha de reação do antígeno e seu significado

Intensidade da linha de reação do antígeno	(R)	Índice
Menor que \pm	$R < \pm$	-
Igual a \pm	$R = \pm$	\pm
Maior que \pm mas menor ou igual a 1+	$\pm < R \leq 1+$	1+
Maior que 1 + mas menor que 3+	$1+ < R < 3+$	2+
Igual a 3+	$R = 3 +$	3+
Maior que 3+	$R > 3 +$	4+

Um teste é negativo para anticorpos VIH, se todas as linhas forem negativas ($< \pm$) ou se uma linha tiver um índice de \pm e as outras linhas forem negativas.

Um teste é indeterminado para anticorpos VIH se duas ou mais linhas tiverem um índice \pm , se uma linha tiver um índice positivo ($\geq 1 \pm$) e as outras linhas negativas ou \pm , e caso duas ou mais linhas tiverem um índice positivo ($\geq 1 +$), desde que as condições para VIH positivo descritas em seguida, não sejam preenchidas.

Um teste é positivo para anticorpos VIH se duas linhas tiverem um índice $\geq 1+$, ou seja, duas linhas do mesmo tipo de VIH (sgp120, gp41, sgp 105 ou gp36) e a linha de antígeno p24 e se pelo menos três linhas tiverem um índice $\geq 1+$, uma delas com um antígeno (sgp120, gp41, sgp105 ou gp36). Quando um resultado é interpretado como VIH positivo, efetua-se a diferenciação para anticorpos VIH-1 e anticorpos VIH-2.

Verifica-se positivo para anticorpos VIH-1 quando um antígeno VIH-1 (sgp120 ou gp41) é positivo ($\geq 1+$), isto é, pode verificar-se reatividade máxima de \pm para uma linha de VIH-2 (sgp105 ou gp36) ou se as linhas do antígeno VIH-1 (sgp120 ou gp41) são positivas ($\geq 1+$), podendo verificar-se uma reatividade máxima de 1+ para uma linha de VIH-2 (sgp105 ou gp36).

Caso seja positivo para VIH-2 tem-se um antígeno (sgp105 ou gp36) positivo ($\geq 1+$), permitindo-se reatividade máxima de \pm para uma linha de VIH-1 (sg120 ou

gp41). Também um resultado positivo para VIH-2 se as linhas do antígeno VIH-2 (sgp105 ou gp36) positivas ($\geq 1+$), podendo ter reatividade máxima de 1+ para uma linha de VIH-1 (sgp120 ou gp41).

Quando se verifica combinações diferentes das descritas anteriormente, é positivo para anticorpos mas sem tipificação.

Após realização destes dois métodos de “*screening*” e o teste confirmatório, se resultados discrepantes, as amostras são enviadas para o Centro Hospitalar de Coimbra, EPE para ser efetuado um terceiro método de “*screening*”, usualmente por ELISA. Contudo, ao proceder-se ao levantamento dos resultados pelo terceiro método de “*screening*” verificou-se que nem todos o tinham, tornando-se uma limitação.

4.2 Caracterização dos resultados falsos positivos no teste de rastreio para o VIH

Como o presente estudo teve como objetivo compreender os resultados falsos positivos obtidos no teste de rastreio para o VIH, procedeu-se ao levantamento dos resultados discrepantes, ou seja, positivo por um método e negativo por outro, tendo em conta que, podem ocorrer resultados discrepantes em casos de infeções recentes pelo VIH. Nestes casos, verificou-se a carga viral, com o intuito de excluir todos os doentes cujo resultado fosse positivo.

A partir do Sistema de Apoio aos Médicos (SAM) procedeu-se a recolha de dados relevantes para o estudo: dados demográficos, dados clínicos, antecedentes pessoais, potenciais fatores de risco, parâmetros laboratoriais e uma descrição mais aprofundada dos resultados falsos positivos obtidos no teste de rastreio para o VIH. Assim, relacionaram-se estes dados de modo a compreender quais os fatores que levariam a um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH.

V- Resultados

5. Caracterização da população em estudo

No período compreendido entre Janeiro de 2010 e Dezembro de 2011, no Centro Hospitalar Baixo Vouga, E.P.E – Aveiro, foram realizados 6981 testes de rastreio à infecção pelo VIH num total de 6302 doentes.

5.1 Análise dos dados demográficos da população em estudo

Do número total de indivíduos que realizaram o teste de rastreio para o VIH, 4377 (69,1%) eram do sexo feminino e 1945 (30,9%) do sexo masculino (Figura 5).

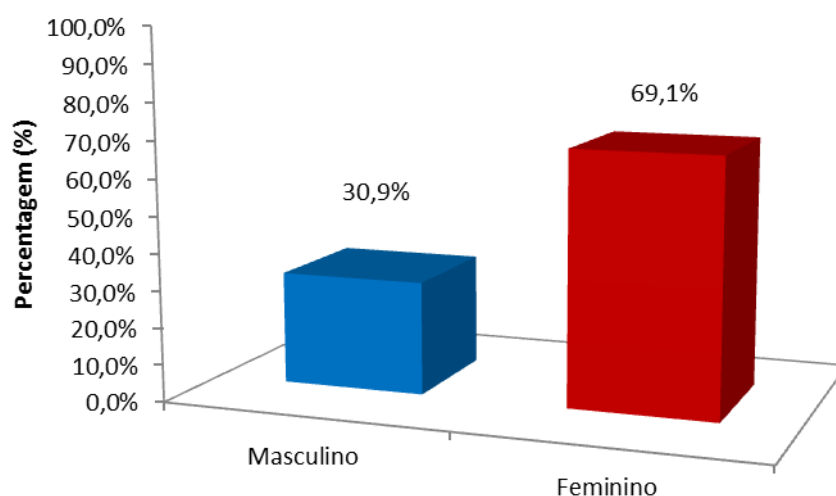


Figura 5 Distribuição do número total de indivíduos que realizaram o teste de rastreio para o VIH por sexo. (Dados referentes a 2010-2011).

De entre estes indivíduos que efetuaram o teste de rastreio à infecção pelo VIH, 87 apresentaram resultado positivo dos quais 67 (77,01%) eram do sexo masculino e 20 (22,99%) do sexo feminino.

Relativamente à faixa etária, a população estudada englobou indivíduos desde 1-90 anos, 22,5% dos quais com idades compreendidas entre os 31 e os 40 anos (Tabela 2).

Tabela 2 Distribuição etária dos indivíduos que realizaram o teste de rastreio do VIH

(Dados referentes a 2010-2011).

Idade	Nº de doentes	Percentagem (%)
0-10	62	0,98
11-20	335	5,32
21-30	1243	19,72
31-40	1416	22,47
41-50	1227	19,47
51-60	823	13,06
61-70	619	9,83
71-80	454	7,20
81-90	123	1,95
Total	6302	100

Outras faixas etárias com importante contribuição para a amostra em estudo são as compreendidas entre os 21 e 30 e entre 41 e os 50 anos, com 1243 (19,72%) e 1227 (19,47%) indivíduos, respetivamente. A faixa etária que apresentou um menor número de indivíduos foi a dos 0 aos 10 anos, com apenas 62 indivíduos analisados (0,98%).

5.2 Distribuição da população em estudo com base no resultado obtido pelo teste de rastreio para o VIH

A população total em estudo foi dividida atendendo aos resultados obtidos no teste de rastreio para o VIH em: negativo (considerado grupo controlo), positivo, falso positivo e indeterminados (Tabela 3).

Tabela 3 Resultados obtidos nos testes de rastreio para o VIH

(Dados referentes a 2010-2011).

Resultado do teste	N.º indivíduos	Percentagem (%)
Negativo	6183	98,11
Positivo	86	1,30
Falso positivo	26	0,43
Indeterminado	6	0,10

Perante a distribuição dos resultados obtidos nos testes de rastreio para o VIH, apresentados na Tabela 3, verifica-se que o resultado mais frequente é negativo, com 6183 indivíduos (98,11%). Um número de indivíduos bastante inferior apresentou um resultado positivo (86 doentes - 1,30%), 26 indivíduos (0,43%) um resultado considerado falso positivo e 6 dos indivíduos (0,10%) apresentaram um resultado indeterminado.

6. Caracterização da população para a qual se obteve um resultado falso positivo no teste de rastreio para o HIV

Os 26 indivíduos que apresentaram um resultado falso positivo para o teste de rastreio para o VIH foram analisados atendendo a parâmetros clínicos e metodológicos.

6.1 Análise dos dados demográficos

O grupo de indivíduos para os quais se obteve um resultado falso positivo incluiu 17 (65,38%) doentes do sexo feminino e 9 (34,61%) do sexo masculino (Figura 6).

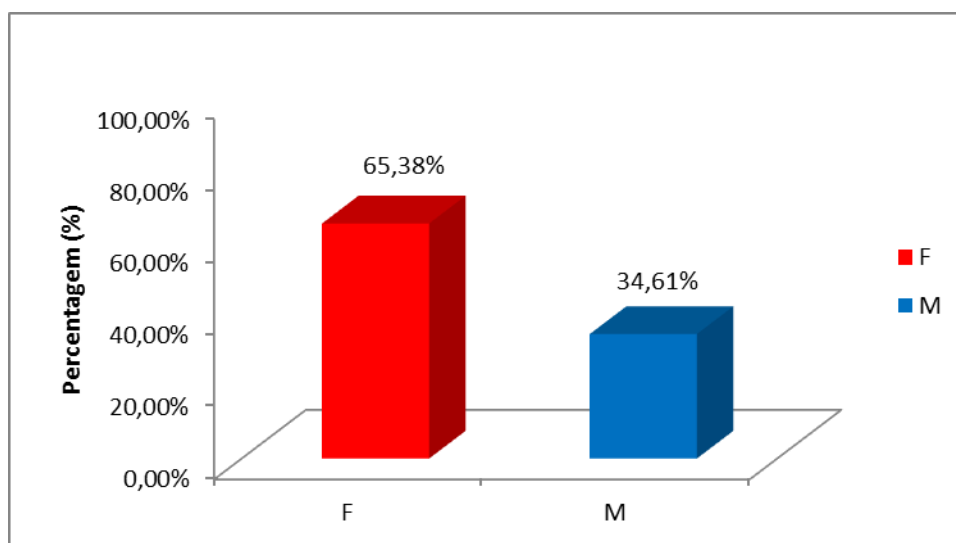


Figura 6 Distribuição do número total de doentes com resultado falso positivo no teste de rastreio pelo VIH por sexo (Dados referentes a 2010-2011)

Em relação a faixa etária, a distribuição da população mostrou que os doentes abrangem uma ampla variedade de idades, dos 6 aos 79 anos (Figura 7).

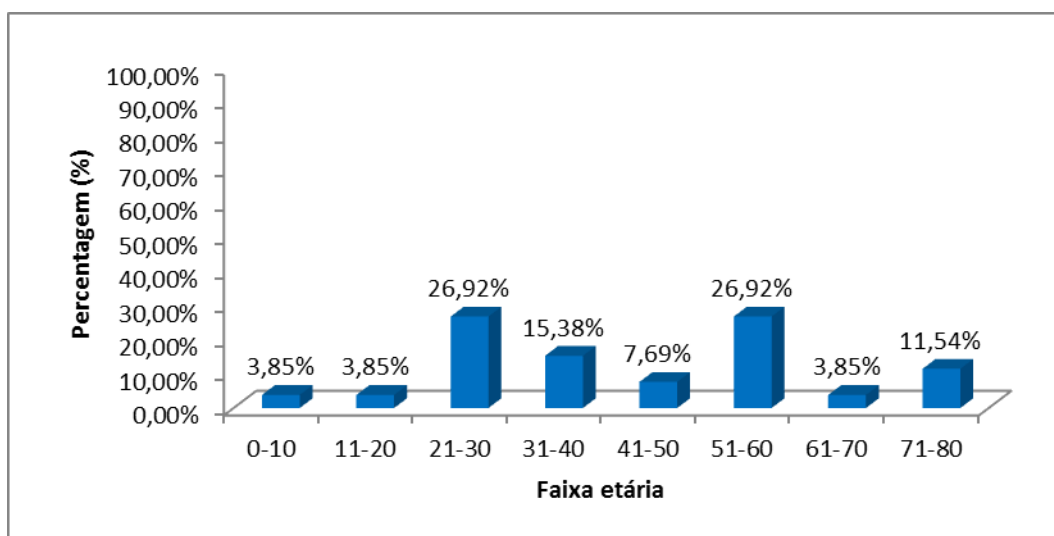


Figura 7 Distribuição do número total de doentes com resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH por faixa etária. (Dados referentes a 2010-2011)

A idade média dos indivíduos envolvidos no estudo foi de 43 ± 19 anos, embora com maior incidência das faixas etárias compreendidas entre os 21-30 anos e 51-60 anos, com 26,92% cada uma.

Na Figura 8 observa-se a distribuição dos indivíduos com resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH segundo a faixa etária e o sexo e a possível relação entre estas variáveis.

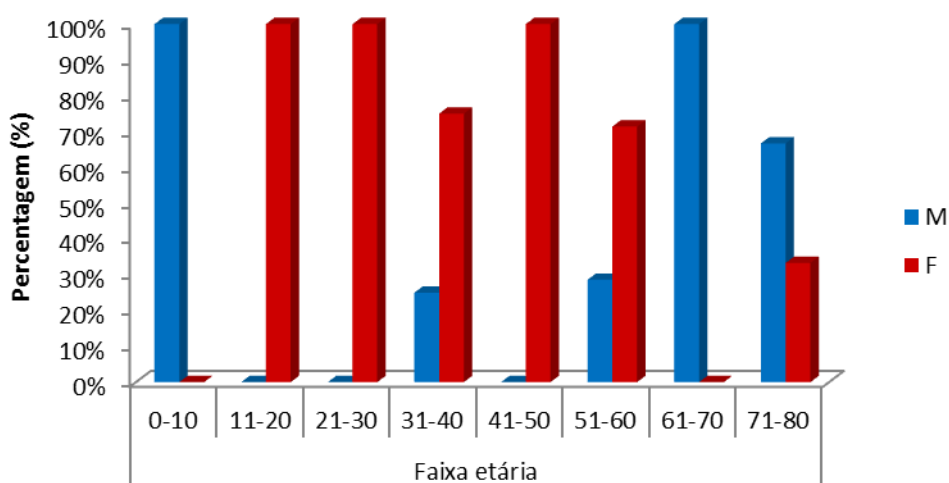


Figura 8 Análise da relação da faixa etária com o género relativo aos indivíduos com resultado falso positivo no teste de rastreio pelo VIH. (Dados referentes a 2010-2011)

Pela análise da Figura 8, verifica-se uma predominância de indivíduos do sexo masculino em idades muito jovens e mais avançadas (0-10 e 51-80 anos). Os indivíduos do sexo feminino predominam nas faixas etárias dos 11-20, 21-30 e 41-50 anos.

6.2 Análise de dados clínicos, antecedentes medicamentosos e parâmetros laboratoriais

Com o intuito de compreender quais os fatores que podem interferir no teste de rastreio do VIH levando a um resultado falso positivo, procedeu-se ao levantamento de parâmetros clínicos e laboratoriais de modo a relacioná-los.

Inicialmente procedeu-se a identificação dos serviços que efetuaram o pedido do teste de rastreio para o VIH, com respetiva distribuição dos doentes pelos mesmos. Na Tabela 4 estão representados os serviços requisitantes e o número de doentes afetados.

Tabela 4 Distribuição dos doentes com resultado no teste VIH falso positivo pelos serviços onde foi requisitado o teste VIH. (Dados referentes a 2010-2011)

Serviço	Número de doentes
Ginecologia /Obstetrícia	10
Medicina Interna	5
Medicina do Trabalho/Saúde Ocupacional	5
Pediatria	1
Nefrologia	1
Reumatologia	1
Infeciologia	1
Psiquiatria	1
Imunoalergologia	1

O serviço de Ginecologia/Obstetrícia foi o serviço com maior número de doentes (n=10) com resultado falso positivo no teste de rastreio do VIH, seguindo-se os serviços de Medicina Interna e Medicina do Trabalho/Saúde Ocupacional, com 5 doentes cada.

Outro parâmetro analisado foi o diagnóstico/condição associada a cada doente aquando da realização dos testes de rastreio para o VIH, pois algumas patologias poderão interferir no resultado destes testes. A Tabela 5 agrupa os doentes de acordo com a avaliação efetuada pelo clínico no momento da requisição do teste.

Tabela 5: Diagnóstico efetuado pelo médico na data do pedido do teste de rastreio para o VIH

(Dados referentes a 2010-2011)

Diagnóstico	Número de doentes
Gravidez	6
Doenças do Sistema Imunológico	5
Doenças do Aparelho Geniturinário	5
Acidente de Trabalho	4
Doença Hepática Crónica	2
Doenças associada ao Sistema Respiratório	2
Doenças do Sistema Endocrinológico	1
Doenças Psiquiátricas	1

Como se pode constatar pela análise da Tabela 5, a gravidez foi a condição prevalente (n=6), seguindo-se as doenças do sistema imunológico e do aparelho geniturinário (n=5), os acidentes de trabalho (n = 4), a doença hepática crónica e doenças associadas ao sistema respiratório (n=2), e por fim com apenas um caso cada, as doenças do sistema endocrinológico e as doenças psiquiátricas.

Uma vez que, segundo a literatura, os antecedentes pessoais de cada doente podem influenciar o resultado do teste de rastreio para o VIH, na Tabela 6 são apresentados os antecedentes pessoais deste mesmo grupo populacional.

Tabela 6: Distribuição dos indivíduos em estudo pelos antecedentes pessoais

Antecedentes	Número de doentes
Síndrome Depressivo	4
Alcoolismo Crónico	4
Tabagismo	1
Problemas Respiratórios	7
Problemas Cardiovasculares	8
Problemas Endocrinológicos	4
Problemas Gastroenterológicos	5
Problemas Hematológicos	3
Problemas Nefrológicos	4

Problemas Obstétricos	2
------------------------------	----------

De acordo com a Tabela 6, os doentes distribuídos pelos antecedentes pessoais, verificou-se que o grupo populacional apresentava maioritariamente problemas cardiovasculares (n=8), seguindo-se os problemas respiratórios (n=7). Um número inferior de indivíduos, apresentava problemas gastroenterológicos (n=5), problemas endocrinológicos (n=4), alcoolismo crónico (n=4), síndrome depressivo (n=4), problemas hematológicos (n=3) e por fim com apenas um caso tabagismo.

Posteriormente, avaliou-se se os indivíduos em estudo tomavam medicação crónica e em caso positivo qual o tipo de medicação. A Tabela 7 apresenta a sua distribuição de acordo com a classe de medicamentos.

Tabela 7: Distribuição dos indivíduos pelo tipo de medicamentos que tomam de forma crónica

Medicamentação	Número de doentes
Antidiabéticos orais	2
Protetores gástricos	5
Antidepressivos	3
Antiagregantes plaquetários	2
Diuréticos	2
Complexo vitamínicos	2
Anti-hipertensores	3
Antiarrítmicos	2
Imunomoduladores	2
Terapêutica hormonal de substituição	1

Como se pode constatar da análise da Tabela 7, os doentes foram distribuídos por 10 classes de medicamentos. A classe de medicamentos que predomina é a dos protetores gástricos (n=5), seguindo-se a dos anti-hipertensores e antidepressivos (n=3).

Os indivíduos com resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH, apresentaram alterações em parâmetros laboratoriais sugestivas de alterações hematológicas, de coagulação, bioquímicas, iónicas e ferropénicas (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição dos indivíduos com resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH de acordo com os parâmetros laboratoriais que se encontram alterados.

Parâmetro	Valores de referência	Número de doentes com valor alterado em relação aos valores de referência
↓ Hemoglobina	11.5-16.5 g/dL	8
↓ Linfócitos	1.50- 4.00 *10 ⁹ /L	7
↓ Plaquetas	150-500 *10 ⁹ /L	5
↑ Tempo de Protrombina	11.50-15.00	3
↑ Velocidade de sedimentação (VS)	<20 mm	2
↑ Creatinina	0.6-1.2 mg/dL	2
↑ Aspartato transaminase (AST)	10-37 U/L	5
↑ Alanina transaminase (ALT)	30-65 U/L	8
↑ Gama -glutamyltransferase (γ-GT)	5-85 U/L	8
↑ Lactato desidrogenase (LDH)	100-190 U/L	9
↓ Sódio (Na ⁺)	136.0-146.0 mEq/L	10
↓ Cloro (Cl ⁻)	98.0-106.0 mEq/L	
↓ Potássio (K ⁺)	3.50-5.10 mEq/L	
↓ Cálcio (Ca ²⁺)	8.8-10.8 mg/dL	
↓ Magnésio (Mg ²⁺)	1.90-2.50 mg/dL	
↓ Ferritina	20-291 ng/mL	3
↓ Ferro	50.0- 170.0 µg/dL	

Como se verifica pela análise da Tabela 8, 10 doentes apresentavam alterações iónicas e 9 tinham alterações ao nível da lactato desidrogenase. Um número significativo de indivíduos tinha anemia (diminuição da hemoglobina) e 3 dos indivíduos alterações ferropénicas (diminuição da ferritina e do ferro). Em dois doentes foram encontradas alterações na velocidade de sedimentação e da creatinina sérica. Um número considerável de indivíduos apresentava alterações nas provas da função hepática (aumento da AST, aumento da ALT e aumento da γ-GT) e prolongamento do tempo de protrombina.

7.3 Análise dos métodos usados para rastreio do VIH

Os métodos utilizados para o rastreio do VIH foram a quimioluminescência e Elfa, posteriormente confirmados pelo teste Inno-LIA. Quando os resultados são positivos para estes testes, as amostras são enviadas para o Centro Hospitalar de Coimbra, EPE

para serem analisadas por um terceiro método de *screening*. Porém e para efeitos do presente estudo, não foi possível obter os resultados deste teste para todos os doentes.

Em relação ao primeiro método de *screening* por quimioluminescência, efetuou-se $2,67 \pm 2,04$ testes por doente, enquanto no método de Elfa realizaram-se $2,30 \pm 0,78$ testes por doente.

Do número total dos indivíduos em estudo, 26 obtiveram um resultado falso positivo. Os resultados obtidos com diferentes métodos foram discrepantes tendo-se verificado que 23 (88,46 %) dos doentes apresentavam as seguintes condições: um resultado positivo por quimioluminescência, um resultado negativo por ELFA e um resultado confirmatório negativo. Os restantes 3 (11,54 %) apresentaram um resultado positivo por ELFA, um resultado negativo por quimioluminescência e negativo no teste confirmatório.

No período estudado, o teste de rastreio pelo VIH foi pedido mais que uma vez a 3 doentes, sendo o resultado obtido igual, ou seja, um falso positivo.

7.4 Prevalência dos falsos positivos no teste de rastreio para o VIH nas grávidas

Após a análise dos resultados relativos ao diagnóstico verificou-se que as grávidas constituem o grupo onde predominam os resultados falso positivos para o rastreio do VIH (Tabela 9). Assim, analisou-se este grupo isoladamente tendo-se observado um total de 1211 de grávidas na população em estudo (Tabela 9).

Tabela 9: Distribuição do número total de grávidas consoante o resultado obtido no teste de rastreio para o VIH

Resultado	Nº de grávidas
Negativo	1203
Positivo	2
Falso positivo	6

Da análise da Tabela 9 pode constatar-se que do total de grávidas ($n=1211$) que fizeram o teste de rastreio para o VIH, 1203 tiveram um resultado negativo, 2 um resultado positivo e 6 um resultado falso positivo.

7.5 Prevalência do Citomegalovirus nos indivíduos com resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH

Na análise dos processos clínicos de cada doente para o qual se obteve resultado falso positivo no teste para o VIH, verificou-se ainda que o resultado dos testes do Citomegalovirus (IgG e IgM) poderia ter alguma interferência no mesmo. Assim, procedeu-se à análise dos resultados dos testes do Citomegalovírus (CMV) tanto para IgG como para IgM neste grupo populacional e na população em geral de forma a tentar compreender o seu significado. No entanto, nem todos os doentes realizaram este teste.

Tabela 10: Distribuição da população em estudo com base no resultado do teste do Citomegalovirus IgG e IgM

	População geral	Falsos Positivos
CMV IgG positivo	1148	8
CMV IgG negativo	313	0
CMV IgM positivo	20	1
CMV IgM negativo	1538	9

Pela análise da Tabela 10, verifica-se que 8 doentes com resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH apresentavam imunidade para o CMV e apenas um doente apresentava infeção aguda pelo Citomegalovírus no momento da realização do teste de rastreio para a infeção pelo VIH.

VI. Discussão

Atualmente, a infecção pelo vírus de imunodeficiência humana (VIH) é considerada uma pandemia, tendo uma elevada taxa de incidência. É de elevada importância conhecer a ampla variedade de testes de rastreio para o VIH, assim como as suas limitações. Uma das limitações que se impõe aos testes de rastreio para o VIH é a ocorrência de resultados falsos positivos. Assim, com este trabalho pretende-se obter informação sobre a incidência deste tipo de resultado na população que realizou o teste de rastreio para o VIH no período entre 1 de Janeiro de 2010 e 31 de Dezembro de 2011 e analisar os métodos de rastreio utilizados no Centro Hospitalar de Aveiro – E.P.E.

Nesse sentido, caracterizou-se a população que realizou o teste de rastreio no período compreendido entre 1 de Janeiro de 2010 e 31 de Dezembro de 2011, no Centro Hospitalar de Aveiro – E.P.E. Neste período foram realizados 6981 testes de rastreio à infecção pelo VIH num total de 6302 indivíduos, verificando-se que ocorreram casos em que o mesmo indivíduo foi rastreado por mais que uma vez, durante o período em estudo. Kim *et al.* [2] também se depararam com esta situação, tendo verificado um número de testes de rastreio do VIH (n=155,339) superior ao número de indivíduos (n=132,934) que realizam o teste. Dos 6302 indivíduos que realizaram o teste de rastreio para o VIH, observou-se que a maioria (69,19%) era do sexo feminino (Figura 5). Tendo em consideração, apenas os indivíduos que obtiveram um resultado positivo (n=87), constatou-se que a maioria era do sexo masculino, 77% vs 23 %, no sexo feminino.

Outro dos parâmetros demográficos que se analisou foi a faixa etária. O Centro de Controlo de Doenças e Prevenção recomendou que os indivíduos compreendidos entre os 13 anos e os 64 anos realizassem o teste de rastreio para o VIH com vista a identificar o maior número de pessoas infetadas pelo VIH [80]. Pela análise da Tabela 2 pode verificar-se que a população estudada envolveu indivíduos de quase todas as faixas etárias, ou seja, desde 1-90 anos. Os indivíduos com idades compreendidas entre os 31-40 anos foram os que realizaram um maior número do teste de rastreio para o VIH, com uma percentagem de 23% (1416 doentes), seguindo-se as faixas etárias compreendidas entre os 21-30 e os 41-50 anos que obtiveram uma percentagem de 20%, em ambos os casos. Esta tendência foi também identificada num estudo prévio [2]. Os grupos de doentes com idades compreendidas entre os 0-10 anos e dos 81-90 anos, como era

esperado, foram as que realizaram em menor número o teste de rastreio do VIH, sugerindo que são as faixas etárias nas quais os fatores de risco para a infeção VIH são menos prevalentes, embora, dados recentes, apontem para um aumento crescente da infeção VIH na população idosa, principalmente devido a comportamentos sexuais de risco. Sankar *et al*, sugeriram que até 2015, indivíduos com idade superior a 50 anos vão representar cerca de 50% de todos os indivíduos com VIH/SIDA nos Estados Unidos. Estes autores referem ainda que entre 2001 e 2005, a percentagem da população idosa com VIH aumentou 77%, assim como, em 2007, esta mesma população tinha uma percentagem de 15% de novas infeções. Vários estudos verificam que tanto os idosos como os adultos jovens estão envolvidos em comportamento de risco semelhantes, contudo a população idosa não percebe o risco a que está exposta ao VIH e são bastante relutantes em tomar medidas preventivas [81].

No presente estudo, a população que realizou o teste de rastreio para o VIH foi organizada por grupos, consoante os resultados obtidos pelo mesmo, tendo-se assim, formado 4 grupos: negativo, positivo, falso positivo e indeterminados. Pela análise da Tabela 3, podemos verificar que o resultado que predomina (98,11%), é o resultado negativo, com 6183 indivíduos. Com um resultado positivo, obtiveram-se 86 indivíduos (1,30%) correspondentes aos anos de 2010 e 2011, o que se encontra de acordo com a incidência estimada de VIH na população portuguesa em 2009 pelo Programa das Nações Unidas sobre o VIH/SIDA (0,6%) [1]. Os resultados indeterminados também foram avaliados, obtendo-se apenas 6 indivíduos, que correspondiam a uma percentagem de 0,10%. Também se verificou que os resultados falso positivos tiveram uma percentagem baixa, de 0,43%, com 26 indivíduos, o que está de acordo com o observado em outro estudo em que se verificaram uma taxa de falsos positivos 0,3% a 0,8% nos ensaios de quarta geração [82]. Um resultado falso positivo, mesmo tendo uma percentagem reduzida, leva a que se proceda ao seu estudo mais pormenorizado, atendendo às implicações clínicas subjacentes.

Deste modo, pretendeu-se caracterizar os indivíduos que obtiveram um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH, analisando os dados clínicos de cada indivíduo.

Inicialmente procedeu-se à análise dos dados demográficos dos 26 indivíduos com um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH. Assim, verificou-se que a maioria era do sexo feminino (65,38%) (Figura 6). Este facto foi também verificado no estudo de Kim *et al*. [2] que referiam que caso se testasse 1 milhão de amostras de cada

género, nas mesmas condições, obtinha-se cerca de 2,490 resultados falsos positivos para o sexo feminino contra 1,970 do sexo masculino.

Por outro lado, foi analisada a distribuição dos indivíduos segundo a sua faixa etária, verificando-se que estes abrangem uma ampla variedade de idades, nomeadamente dos 6-79 anos (Figura 7). A idade média dos indivíduos envolvidos em estudo foi de $43 \pm 18,81$ anos.

Quando se procedeu à análise das diferentes faixas etárias, verificou-se que as mais predominantes são as compreendidas entre os 21-30 anos e 51-60 anos, com uma percentagem de 27%, em cada faixa etária, correspondendo a primeira à idade jovem adulta e a segunda ao início da terceira idade.

No sentido de se poder verificar uma possível relação entre o sexo e a faixa etária, fez-se o cruzamento dos resultados de ambas as variáveis. Pela análise da Figura 8, verificou-se que a distribuição dos indivíduos do sexo masculino ocorre principalmente nos extremos das idades (0-10 e 51-80 anos). Em relação ao sexo feminino observou-se que a sua distribuição era predominante nas faixas etárias dos 11-20, 21-30 e 41-50 anos, ou seja, predominante na idade fértil, possivelmente sob efeito de contraceptivos orais, assim como de , terapêutica de substituição hormonal, o que segundo a literatura poderá indiciar alterações hormonais que explicariam os falsos positivos obtidos em alguns dos indivíduos do sexo feminino [83].

Após a avaliação dos dados demográficos, fez-se a análise dos serviços que requisitaram o pedido do teste de rastreio para o VIH, verificando-se, a partir da Tabela 4, que o serviço de Ginecologia/Obstetrícia foi o serviço de origem com maior número de indivíduos com resultado falso positivo ($n=10$; Tabela 4).

Outro parâmetro analisado foi o diagnóstico efetuado a cada doente com resultado falso positivo, aquando do pedido do teste de rastreio, pois como referido na literatura, este tipo de resultado poderá estar associado a várias causas [7, 75]. Na Tabela 5, agruparam-se os doentes de acordo com os diagnósticos efetuados no momento da requisição do teste, verificando-se que, 6 dos 26 indivíduos estudados, encontravam-se em seguimento por gravidez, sendo o teste de rastreio nestas mulheres idealmente realizado no período de planeamento familiar e ainda ao longo da gravidez. Vários estudos têm indicado que a gravidez é uma das condições que mais está associada a um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH [6]. Assim, o fato de o número mais indicativo de indivíduos com um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH ser atribuído à gravidez, indica que o estado de gravidez poderá eventualmente

estar a comprometer a integridade do teste. Os dados apresentados por Mylonakis *et al.*, [75] mostram que não só a gravidez está associada a um resultado falso positivo, mas que também estão relacionadas: as doenças auto-imunes, insuficiência renal, fibrose cística, transfusões, doença hepática, hemodiálise e a vacinação para a hepatite B, raiva ou gripe. Pela análise da Tabela 5, verificou-se ainda 2 casos com o diagnóstico de Doença Hepática Crónica e 5 casos com patologia do Sistema Imunológico, estando de acordo com as causas possíveis descritas [75], para um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH. Outros diagnósticos efetuados no grupo de doentes com resultado falso positivo, foram: as doenças do Aparelho Geniturinário (n=5), os acidentes de trabalho (n=4), as doenças associadas ao Sistema Respiratório (n=2), as doenças do Sistema Endocrinológico e as doenças psiquiátricas (n=1), que, embora não estejam descritas na literatura como causas diretas de possíveis resultados falsos positivos no teste de rastreio do VIH, os indivíduos envolvidos no estudo poderão apresentar características clínicas ou analíticas relevantes e modificadoras do teste.

Além do diagnóstico, fez-se o levantamento dos antecedentes clínicos de cada doente. De acordo com a Tabela 6, verificou-se que o grupo populacional apresentava maioritariamente problemas cardiovasculares (n=8), seguindo-se os problemas respiratórios (n=7). Ao comparar-se com o descrito na literatura constata-se que não existe uma relação direta, contudo este tipo de antecedentes estão de acordo com a amostra em estudo, dado tratarem-se de patologias muito frequentes em algumas faixas etárias (amostra em estudo, com uma percentagem de 42,31% de indivíduos com mais de 50 anos) [84].

É ainda de referir, que nenhum dos doentes com um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH tinha antecedentes de transfusão, nem que os doentes com antecedentes nefrológicos se encontravam em regime de hemodiálise, pois tanto a transfusão como a hemodiálise são duas das associações referidas na literatura [75].

Outro dos parâmetros estudados para melhor caracterizar a população, foi a medicação crónica de cada indivíduo. Pela análise da Tabela 7, observou-se que a classe de medicamentos mais frequentes foi a dos protetores gástricos (n=5), podendo relacionar-se com o número de indivíduos que apresentavam problemas gastroenterológicos (n=5).

Os indivíduos com resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH, apresentavam algumas alterações nos parâmetros laboratoriais, tais como, alterações hematológicas, de coagulação, bioquímicas, iónicas e ferropénicas. Pela análise da

Tabela 8 verifica-se que um dos parâmetros laboratoriais que se encontrava alterado era a hemoglobina, indicando que 31% dos indivíduos tinham anemia. Também a nível hepático verificaram-se alterações a nível da gama-glutamyltransferase (31%), alanina transaminase (31%), aspartato transaminase (19%), e no tempo de protombina (12%). Por fim, verificaram-se alterações na creatinina (8%) sugestivas de algum grau de disfunção renal. Tanto as alterações hepáticas, como as renais estão de acordo com os diagnósticos e antecedentes pessoais da população estudada.

Os métodos laboratoriais usados para o rastreio para o VIH, no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E – Aveiro, foram a quimioluminescência, o ensaio imunoenzimático ligado a fluorescência (ELFA) e o teste confirmatório Inno-LIA. Depois de se proceder à realização destes testes, e de se verificarem resultados discrepantes entre os métodos, é necessário proceder-se à realização de um terceiro método de *screening*, normalmente por ELISA, pedido ao Centro Hospitalar de Coimbra, EPE. Contudo, na recolha dos resultados relativos a este terceiro método, verificou-se a não existência do registo do resultado deste teste para todos os doentes, o que impossibilitou a sua análise.

O primeiro método de *screening* foi a quimioluminescência através do imunoensaio ADVIA Centaur XP[®]. Este ensaio deteta qualitativamente anticorpos do vírus de imunodeficiência humana tipo 1 (incluindo o tipo O) e o tipo 2, no soro ou plasma. Num estudo de Dwyer *et al* [85] pretendeu-se avaliar a *performance* a nível europeu, utilizaram-se 5842 amostras, tendo-se observado que 419 pacientes encontravam-se infetados com HIV-1 e 100 com HIV-2, e em 25 amostras detetaram os subtipos A;B,C,D,E,F,G e O e 25 subtipos não – B, tendo-se obtido uma sensibilidade de 100% (554/554) e uma especificidade de 99,9% (5281/5288).

O segundo método de *screening*, foi o ELFA em que se utilizou o sistema mini VIDAS DUO. Este sistema é um ensaio enzimático ligado à fluorescência que permite a deteção simultânea do antígeno p24 e dos anti-anticorpos do VIH-1 (incluindo o grupo O) e do VIH-2. No presente estudo, verificou-se que nos 26 indivíduos que obtiveram um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH, 23 (88%) dos indivíduos apresentavam um resultado positivo por quimioluminescência, discrepante do resultado posteriormente obtido por ELFA e pelo teste confirmatório. O facto da percentagem, relativa a positividade do teste ser deste método ser tão elevada, pode indicar que o método em si pode ter algumas limitações que permitam a ocorrência de falsos positivos. Por ELFA, verificou-se que apenas 3 dos indivíduos apresentaram um

resultado positivo. Assim, verifica-se que por quimioluminescência obtém-se um número superior de resultados falsos positivos comparativamente a ELFA. Alguns estudos demonstram que os imunoenaios enzimáticos da quarta geração, que combinam dois testes diferentes num só ensaio, apresentam um risco mais elevado de reacções inespecíficas, do que os teste com anticorpos de segunda e da terceira geração. A taxa de falsos positivos pode variar de 0,3% a 0,8% comparativamente a 0,2% por ensaios enzimáticos da terceira geração. Também se verificou que o ensaio VIDAS DUO HIV apresentava um melhor resultado no diagnóstico precoce da infeção pelo VIH e maior sensibilidade em comparação a outros ensaios da quarta geração. Após os ensaios da quarta geração serem lançados em 2001, *Weber* [2] reportou para estes testes uma especificidade de 99.50% e 99.90%.

No que diz respeito à contabilização do número de teste realizados para cada doente e para cada método, verificou-se que para o primeiro método de “*screening*” obteve-se uma média de $2,67 \pm 2,04$ testes por cada doente, enquanto que no segundo método a média foi de $2,30 \pm 0,78$ testes por cada doente.

A análise mais pormenorizada dos indivíduos com resultado falso positivo, evidenciou a prevalência do grupo das grávidas. Nesse sentido, procedeu-se ao levantamento do número total de grávidas, bem como ao resultado obtido no teste de rastreio para o VIH. Das 1211 grávidas que realizaram o teste de rastreio para o VIH, 99,34% obtiveram um resultado negativo, 0,17% um resultado positivo e 0,50% um resultado falso positivo (Tabela 9).

A percentagem de falsos positivos é muito reduzida quando se compara com o número total de grávidas que realizaram o teste de rastreio para o VIH, porém quando se analisa os 26 indivíduos que obtiveram um resultado falso positivo, constata-se que é bastante significativo, apresentando uma percentagem de 23,08%. *Shima-Sano et al*, estudaram as elevadas taxas de resultados falsos positivos presentes nas mulheres grávidas na China e salientaram a importância do teste de rastreio pré natal para o VIH na prevenção da transmissão de mãe para filho. A ocorrência de resultados falsos positivos nos testes de rastreio para o VIH pode causar ansiedade e stress emocional à grávida enquanto aguarda a confirmação do mesmo. Com o intuito de reduzirem o número de falsos positivos, propuseram um algoritmo para o rastreio do VIH, que consistia em usar dois ensaios imunoenzimáticos da quarta geração. Os métodos de rastreio usados foram o Enzygnost VIH Integral e o VIDAS VIH DUO Quick, verificando-se que após o uso de dois imunoenaios da quarta geração o número de

falsos positivos reduziu de 0,4% para 0%. Contudo a utilização de ensaios da quarta geração, não significa que não se verifique falsos positivos nas grávidas como se pode verificar nos resultados obtidos neste estudo [73].

À medida que se procedeu ao levantamento dos dados clínicos, outro dos parâmetros que se estudou foi o resultado do teste do Citomegalovírus, tanto para IgG como para IgM, verificando-se que nem todos os indivíduos tinham realizado o teste. Após a análise da Tabela 10, verificou-se que 31% dos indivíduos com um resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH, apresentavam-se imunizados para o CMV e apenas 4% dos indivíduos apresentavam infeção aguda pelo Citomegalovírus no momento da realização do teste de rastreio para o VIH [86].

As condições descritas na literatura sugerem que pode haver uma estimulação imune generalizada que induz a produção de anti-HLA-DR ou anticorpos não específicos que têm uma reação cruzada com os kits usados no teste de rastreio para o VIH, o que poderá interferir com os resultados desse mesmo teste levando a que se obtenha um resultado falso positivo [87].

VII. Conclusão

Neste trabalho foi feita a análise dos resultados falsos positivos obtidos no teste de rastreio do VIH, efetuado no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E – Aveiro. Verificou-se que os resultados falsos positivos tiveram uma prevalência de 0,46%, correspondente a 26 indivíduos, no período compreendido entre 1 de Janeiro de 2010 e 31 Dezembro de 2011.

Os indivíduos que apresentavam um resultado falso positivo, eram maioritariamente do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 21-30 e 51-60 anos, parecendo predominar na idade fértil e no início da menopausa. Os indivíduos do sexo masculino predominaram em faixas etárias muito jovens e muito avançadas.

A condição mais associada a falsos positivos foi a gravidez. Assim, estudos futuros dirigidos para uma população significativa de grávidas serão importantes a fim de estabelecer uma relação entre fatores como a paridade e o resultado falso positivo no teste de rastreio para o VIH.

A população estudada apresentava maioritariamente problemas cardiovasculares e respiratórios.

As alterações laboratoriais verificadas, estavam relacionadas com doença hepática, uma potencial causa de falsos positivos para o teste de rastreio para o VIH.

Na avaliação da *performance* dos métodos usados no rastreio do VIH, pode inferir-se que a falsa positividade era mais significativa nos testes de quimioluminescência do que nos de ELFA.

Os resultados obtidos pelo teste do CMV poderão indicar interferência nos resultados obtidos no teste de rastreio para o VIH. Seria aconselhável um estudo posterior, com um maior número de amostras para verificar se existe relação entre CMV e a ocorrência de falsos positivos.

Existe uma ampla variedade de fatores que interferem com os resultados do teste de rastreio do VIH e que aqui não foram estudados, devido a amostra ser pequena e não haver disponibilidade de toda a informação pretendida. Seria uma mais valia avaliar esses fatores numa população mais representativa.

VIII. Bibliografia

1. *AIDS Epidemic Update*. 2009 [cited 2011 26 de Novembro]; Available from: <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/epidemiology/2009aidsepidemicupdate/>.
2. Kim, S., J.H. Lee, J.Y. Choi, J.M. Kim, and H.S. Kim, *False-positive rate of a "fourth-generation" HIV antigen/antibody combination assay in an area of low HIV prevalence*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(10): p. 1642-4.
3. Lala, M.M. and R.H. Merchant, *Vertical transmission of HIV-An update*. Indian Journal of Pediatrics, 2010. **77**(11): p. 1270-1276.
4. Fox, J. and S. Fidler, *Sexual transmission of HIV-1*. Antiviral Research, 2010. **85**(1): p. 276-285.
5. Gasasira, A.F., G. Dorsey, M.R. Kamya, D. Havlir, M. Kiggundu, P.J. Rosenthal, and E.D. Charlebois, *False-positive results of enzyme immunoassays for human immunodeficiency virus in patients with uncomplicated malaria*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(8): p. 3021-3024.
6. Wesolowski, L.G., K.P. Delaney, M.A. Lampe, and S.R. Nesheim, *False-positive human immunodeficiency virus enzyme immunoassay results in pregnant women*. PLoS ONE, 2011. **6**(1).
7. Guan, M., *Frequency, causes, and new challenges of indeterminate results in western blot confirmatory testing for antibodies to human immunodeficiency virus*. Clinical and Vaccine Immunology, 2007. **14**(6): p. 649-659.
8. Andrews, G., D. Skinner, and K. Zuma, *Epidemiology of health and vulnerability among children orphaned and made vulnerable by HIV/AIDS in sub-Saharan Africa*. AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV, 2006. **18**(3): p. 269-276.
9. *Infecção VIH/SIDA: A Situação em Portugal a 31 de Dezembro de 2010*. 2011 [cited 2011 28 de Novembro]; Available from: <http://www.insa.pt/>.
10. Ganser-Pornillos, B.K., M. Yeager, and W.I. Sundquist, *The structural biology of HIV assembly*. Current Opinion in Structural Biology, 2008. **18**(2): p. 203-217.
11. Briggs, J.A.G. and H.G. Kräusslich, *The molecular architecture of HIV*. Journal of Molecular Biology, 2011. **410**(4): p. 491-500.
12. Wilkinson, K.A., R.J. Gorelick, S.M. Vasa, N. Guex, A. Rein, D.H. Mathews, M.C. Giddings, and K.M. Weeks, *High-Throughput SHAPE Analysis Reveals Structures in HIV-1 Genomic RNA Strongly Conserved across Distinct Biological States*. PLoS Biol, 2008. **6**(4): p. e96.
13. *Estrutura do HIV*. Jornal de Ciência, Tecnologia e Empreendedorismo 2009 [cited 2011 30 de Dezembro]; Available from: <http://www.cienciahoje.pt/index.php?oid=30481&op=all>.
14. Buonaguro, L., M.L. Tornesello, and F.M. Buonaguro, *Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: Pathogenetic and therapeutic implications*. Journal of Virology, 2007. **81**(19): p. 10209-10219.
15. Depatureaux, A., C. Charpentier, G. Collin, M. Leoz, D. Descamps, A. Vessière, F. Damond, D. Rousset, F. Brun-Vézinet, and J.C. Plantier, *Baseline genotypic and phenotypic susceptibilities of HIV-1 group O to enfuvirtide*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010. **54**(9): p. 4016-4019.
16. Butler, I.F., I. Pandrea, P.A. Marx, and C. Apetrei, *HIV genetic diversity: Biological and public health consequences*. Current HIV Research, 2007. **5**(1): p. 23-45.
17. Raboni, S.M., S.M. de Almeida, I. Rotta, C.E.L. Ribeiro, D. Rosario, L.R. Vidal, M.B. Nogueira, M. Riedel, M. da Graça Winhescki, K.A. Ferreira, and R. Ellis, *Molecular*

- epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2010. **105**(8): p. 1044-1049.
18. Takebe, Y., S. Kusagawa, and K. Motomura, *Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS pandemic*. Pediatrics International, 2004. **46**(2): p. 236-244.
19. Robertson, D.L., J.P. Anderson, J.A. Bradac, J.K. Carr, B. Fole, R.K. Funkhouser, F. Gao, B.H. Hahn, M.L. Kalish, C. Kuiken, G.H. Learn, T. Leitner, F. McCutchan, S. Osmanov, M. Peeters, D. Pieniazek, M. Salminen, P.M. Sharp, S. Wolinsky, and B. Korber, *HIV-1 nomenclature proposal*. Science, 2000. **288**(5463): p. 55-57.
20. Torian, L.V., J.J. Eavey, A.P. Punsalang, R.E. Pirillo, L.A. Forgione, S.A. Kent, and W.R. Oleszko, *HIV type 2 in New York City, 2000-2008*. Clinical Infectious Diseases, 2010. **51**(11): p. 1334-1342.
21. Pomerantz, R.J. and D.L. Horn, *Twenty years of therapy for HIV-1 infection*. Nature Medicine, 2003. **9**(7): p. 867-873.
22. Smith, J.A. and R. Daniel, *Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses*. ACS chemical biology, 2006. **1**(4): p. 217-226.
23. Pancera, M., S. Majeed, Y.E.A. Ban, L. Chen, C.C. Huang, L. Kong, Y.D. Kwon, J. Stuckey, T. Zhou, J.E. Robinson, W.R. Schief, J. Sodroski, R. Wyatt, and P.D. Kwong, *Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(3): p. 1166-1171.
24. Zheng, Y.H., N. Lovsin, and B.M. Peterlin, *Newly identified host factors modulate HIV replication*. Immunology Letters, 2005. **97**(2 SPEC. ISS.): p. 225-234.
25. *Ciclo de vida do HIV f.* [cited 2011 1 de Dezembro]; Available from: <http://albericomarcosbioifes.wordpress.com/tag/hiv/>.
26. Hunt, P.W., *Role of immune activation in HIV pathogenesis*. Current HIV/AIDS Reports, 2007. **4**(1): p. 42-47.
27. Levy, J.A., *HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research*. Advances in dental research., 2006. **19**(1): p. 10-16.
28. Blattner, W.A., K.A. Oursler, F. Cleghorn, M. Charurat, A. Sill, C. Bartholomew, N. Jack, T. O'Brien, J. Edwards, G. Tomaras, K. Weinhold, and M. Greenberg, *Rapid clearance of virus after acute HIV-1 infection: Correlates of risk of AIDS*. Journal of Infectious Diseases, 2004. **189**(10): p. 1793-1801.
29. Ribeiro, R.M., L. Qin, L.L. Chavez, D. Li, S.G. Self, and A.S. Perelson, *Estimation of the initial viral growth rate and basic reproductive number during acute HIV-1 infection*. Journal of Virology, 2010. **84**(12): p. 6096-6102.
30. Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, W.E. Paul, and L.J. Picker, *Pathogenesis of HIV infection: What the virus spares is as important as what it destroys*. Nature Medicine, 2006. **12**(3): p. 289-295.
31. Rodriguez, J.F., L.C. Montero, H.S. Casado, and G.C. Herrero, *Kaposi's sarcoma (KS) associated with human immunodeficiency virus infection (HIV)*. Sarcoma de Kaposi (SK) asociado a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), 2008. **22**(6): p. 274-282.
32. Thompson, L.D.R., M.S.I. Fisher, W.S. Chu, A. Nelson, and S.L. Abbondanzo, *HIV-Associated Hodgkin Lymphoma: A Clinicopathologic and Immunophenotypic Study of 45 Cases*. American Journal of Clinical Pathology, 2004. **121**(5): p. 727-738.
33. Cook, P.F., K.H. Sousa, E.E. Matthews, P.M. Meek, and J. Kwong, *Patterns of change in symptom clusters with HIV disease progression*. Journal of Pain and Symptom Management, 2011. **42**(1): p. 12-23.
34. Nakamura, H., K. Teruya, M. Takano, K. Tsukada, J. Tanuma, H. Yazaki, H. Honda, M. Honda, H. Gatanaga, Y. Kikuchi, and S. Oka, *Clinical symptoms and courses of primary HIV-1 infection in recent years in Japan*. Internal Medicine, 2011. **50**(2): p. 95-101.

35. Valencia, C.P., G.E. Canaval, V. Rizo, D. Correa, and D. Marín, *Signs and symptoms in persons that living with HIV/AIDS*. Signos y síntomas en personas que viven con el virus del sida (PVVS) en Cali, Colombia, 2007. **38**(4): p. 365-374.
36. Gkrania-Klotsas, E. and A.E. Klotsas, *HIV and HIV treatment: Effects on fats, glucose and lipids*. British Medical Bulletin, 2007. **84**(1): p. 49-68.
37. Samarasinghe, Y.P., *HIV and diabetes*. Primary Care Diabetes, 2007. **1**(2): p. 99-101.
38. Sherr, L., C. Clucas, R. Harding, E. Sibley, and J. Catalan, *HIV and depression - A systematic review of interventions*. Psychology, Health and Medicine, 2011. **16**(5): p. 493-527.
39. Rodkjaer, L., T. Laursen, N. Balle, and M. Sodemann, *Depression in patients with HIV is under-diagnosed: A cross-sectional study in Denmark*. HIV Medicine, 2010. **11**(1): p. 46-53.
40. Ferreira, C., M.C. Gay, F. Regnier-Aeberhard, and F. Bricaire, *Representation of illness and of treatment side effects as determinants of adherence to treatment of HIV patients*. Les représentations de la maladie et des effets secondaires du traitement antirétroviral comme déterminants de l'observance chez les patients VIH, 2010. **168**(1): p. 25-33.
41. Minga, A., L. Dohoun, Y. Abo, A. Coulibaly, S. Konaté, H.P. Ouattara, B.K. N'Guessan, F. Dabis, R. Salamon, and C. Lewden, *Risk behaviors in volunteer blood donors who seroconverted for HIV, Abidjan, Côte d'Ivoire 1997 to 2005*. Transfusion, 2010. **50**(4): p. 888-893.
42. Mathers, B.M., L. Degenhardt, B. Phillips, L. Wiessing, M. Hickman, S.A. Strathdee, A. Wodak, S. Panda, M. Tyndall, A. Toufik, and R.P. Mattick, *Global epidemiology of injecting drug use and HIV among people who inject drugs: a systematic review*. The Lancet, 2008. **372**(9651): p. 1733-1745.
43. Soilleux, E.J. and N. Coleman, *Transplacental transmission of HIV: A potential role for HIV binding lectins*. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2003. **35**(3): p. 283-287.
44. Lekkerkerker, A.N., Y. van Kooyk, and T.B.H. Geijtenbeek, *Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission*. Current HIV Research, 2006. **4**(2): p. 169-176.
45. Wawer, M.J., R.H. Gray, N.K. Sewankambo, D. Serwadda, X. Li, O. Laeyendecker, N. Kiwanuka, G. Kigozi, M. Kiddugavu, T. Lutalo, F. Nalugoda, F. Wabwire-Mangen, M.P. Meehan, and T.C. Quinn, *Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda*. Journal of Infectious Diseases, 2005. **191**(9): p. 1403-1409.
46. Eaton, L.A., S.C. Kalichman, D.A. O'Connell, and W.D. Karchner, *A strategy for selecting sexual partners believed to pose little/no risks for HIV: Serosorting and its implications for HIV transmission*. AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV, 2009. **21**(10): p. 1279-1288.
47. Kurth, A.E., C. Celum, J.M. Baeten, S.H. Vermund, and J.N. Wasserheit, *Combination HIV prevention: Significance, challenges, and opportunities*. Current HIV/AIDS Reports, 2011. **8**(1): p. 62-72.
48. Des Jarlais, D.C. and S. Semaan, *HIV prevention for injecting drug users: The first 25 years and counting*. Psychosomatic Medicine, 2008. **70**(5): p. 606-611.
49. Shearer, G. and M. Clerici, *Historical perspective on HIV-exposed seronegative individuals: Has nature done the experiment for us?* Journal of Infectious Diseases, 2010. **202**(SUPP.3): p. S329-S332.
50. Ahmad, N., *Molecular mechanisms of HIV-1 mother-to-child transmission and infection in neonatal target cells*. Life Sciences, 2011. **88**(21-22): p. 980-986.
51. Ly, T.D. and S. Laperche, *Early detection of human immunodeficiency virus infection using third- and fourth-generation screening assays*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2001. **20**(2): p. 104-110.

52. Respass, R.A., M.A. Rayfield, and T.J. Dondero, *Laboratory testing and rapid hiv assays: Applications for HIV surveillance in hard-to-reach populations*. AIDS, 2001. **15**(SUPPL. 3): p. S49-S59.
53. Pai, N.P., J.P. Tulskey, D. Cohan, J.M. Colford Jr, and A.L. Reingold, *Rapid point-of-care HIV testing in pregnant women: A systematic review and meta-analysis*. Tropical Medicine and International Health, 2007. **12**(2): p. 162-173.
54. *Protocols for confirmation of reactive rapid HIV tests*. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2004. **53**(10): p. 221-222.
55. Chen, J., L. Wang, J.J.Y. Chen, G.K. Sahu, S. Tying, K. Ramsey, A.J. Indrikovs, J.R. Petersen, D. Paar, and M.W. Cloyd, *Detection of antibodies to human immunodeficiency virus (HIV) that recognize conformational epitopes of glycoproteins 160 and 41 often allows for early diagnosis of HIV infection*. Journal of Infectious Diseases, 2002. **186**(3): p. 321-331.
56. Otani, M.M., N.A. Salles, A.M.E. Barreto, C.C. Barreto, D.F. Chamone, and E.C. Sabino, *Evaluation of the concomitant use of two different EIA tests for HIV screening in blood banks*. Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health, 2003. **13**(2-3): p. 172-175.
57. Parekh, B.S. and J.S. McDougal, *Application of laboratory methods for estimation of HIV-1 incidence*. Indian Journal of Medical Research, 2005. **121**(4): p. 510-518.
58. Almeda, J., J. Casabona, L. Matas, V. González, R. Muga, B. Sanz, F. Bolao, and V. Ausina, *Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for HIV screening in urine*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2004. **23**(11): p. 831-835.
59. Goldenberg, S., R. Kulasegaram, B. Peters, G. Panayotakopoulos, and C.Y.W. Tong, *HIV antigen-antibody combination enzyme immunoassay - The experience of a London teaching hospital*. Journal of Medical Virology, 2007. **79**(SUPPL. 1): p. S23-S26.
60. Weber, B., A. Berger, H. Rabenau, and H.W. Doerr, *Evaluation of a new combined antigen and antibody human immunodeficiency virus screening assay, VIDAS HIV DUO Ultra*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(4): p. 1420-1426.
61. Bourlet, T., C. Pretis, S. Pillet, M. Lesenechal, J. Piche, and B. Pozzetto, *Comparative evaluation of the VIDAS HIV DUO Ultra assay for combined detection of HIV-1 antigen and antibodies to HIV*. Journal of Virological Methods, 2005. **127**(2): p. 165-167.
62. Geretti, A.M., *HIV testing and monitoring*. Medicine, 2009. **37**(7): p. 326-329.
63. Beelaert, G. and K. Franssen, *Evaluation of a rapid and simple fourth-generation HIV screening assay for qualitative detection of HIV p24 antigen and/or antibodies to HIV-1 and HIV-2*. Journal of Virological Methods, 2010. **168**(1-2): p. 218-222.
64. Hamatake, M., M. Nishizawa, N. Yamamoto, S. Kato, and W. Sugiura, *A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma*. Journal of Virological Methods, 2007. **142**(1-2): p. 113-117.
65. Jamehdar, S.A., F. Sabahi, M. Forouzandeh, M.H. Abdolbaghi, M. Kazemnejad, and F. Mahboudi, *Evaluation of a new, highly sensitive and specific primer set for reverse-transcriptase PCR detection of HIV-1 infected patients: Comparison with standard primers*. Journal of Biological Sciences, 2007. **7**(6): p. 954-958.
66. Yukl, S.A., P. Li, K. Fujimoto, H. Lampiris, C.M. Lu, C.B. Hare, S.G. Deeks, T. Liegler, M. Pandori, D.V. Havlir, and J.K. Wong, *Modification of the Abbott RealTime assay for detection of HIV-1 plasma RNA viral loads less than one copy per milliliter*. Journal of Virological Methods, 2011. **175**(2): p. 261-265.
67. Paba, P., L. Fabeni, M. Ciccozzi, C.F. Perno, and M. Ciotti, *Performance evaluation of the COBAS/TaqMan HIV-1 v2.0 in HIV-1 positive patients with low viral load: A comparative study*. Journal of Virological Methods, 2011. **173**(2): p. 399-402.
68. Telenti, A., *New developments in laboratory monitoring of HIV-1 infection*. Clinical Microbiology and Infection, 2002. **8**(3): p. 137-143.

69. Lillo, F.B., M.A. Grasso, S. Lodini, M.G. Bellotti, and G. Colucci, *Few modifications of the Cobas Amplicor HIV Monitor 1.5 test allow reliable quantitation of HIV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells*. Journal of Virological Methods, 2004. **120**(2): p. 201-205.
70. Ruibal-Ares, B., L. Belmonte, P. Baré, C. Bayo-Hanza, G. Mendez, R.P. Bianco, M. De Tezanos Pinto, and M.M.E. De Bracco, *Monocyte differentiation and HIV replication after prolonged culture of peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals*. Cellular Immunology, 2001. **210**(1): p. 11-20.
71. Pasquier, C., K. Sandres-Sauné, J.M. Mansuy, B. Puissant, R. Viraben, N. Spenato, M. Miédougé, P. Massip, A. Blancher, and J. Izopet, *Virological exploration of individuals with discordant HIV screening tests*. Journal of Clinical Virology, 2004. **30**(3): p. 218-223.
72. Shida, S., N. Takahashi, N. Fujishima, Y. Kameoka, M. Nara, M. Fujishima, H. Saitoh, H. Tagawa, M. Hirokawa, R. Ichinohasama, and K. Sawada, *False-positive human immunodeficiency virus antibody test and autoimmune hemolytic anemia in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma*. Internal Medicine, 2011. **50**(20): p. 2383-2387.
73. Shima-Sano, T., R. Yamada, K. Sekita, R.W. Hankins, H. Hori, H. Seto, K. Sudo, M. Kondo, K. Kawahara, Y. Tsukahara, N. Inaba, S. Kato, and M. Imai, *A human immunodeficiency virus screening algorithm to address the high rate of false-positive results in pregnant women in Japan*. PLoS ONE, 2010. **5**(2).
74. Wai, C.T. and P.A. Tambyah, *False-positive HIV-1 ELISA in patients with hepatitis B [1]*. American Journal of Medicine, 2002. **112**(9): p. 737.
75. Mylonakis, E., M. Paliou, M. Lally, T.P. Flanagan, and J.D. Rich, *Laboratory testing for infection with the human immunodeficiency virus: Established and novel approaches*. American Journal of Medicine, 2000. **109**(7): p. 568-576.
76. Spencer, D.V., F.S. Nolte, and Y. Zhu, *Heterophilic antibody interference causing false-positive rapid human immunodeficiency virus antibody testing*. Clinica Chimica Acta, 2009. **399**(1-2): p. 121-122.
77. Taegtmeyer, M., P. MacPherson, K. Jones, M. Hopkins, J. Moorcroft, D.G. Lalloo, and A. Chawla, *Programmatic evaluation of a combined antigen and antibody test for rapid HIV diagnosis in a community and sexual health clinic screening programme*. PLoS ONE, 2011. **6**(11).
78. García, T., N. Tormo, C. Gimeno, J.G. de Lomas, and D. Navarro, *Performance of an automated human immunodeficiency virus (HIV) antigen/antibody combined assay for prenatal screening for HIV infection in pregnant women*. Journal of Medical Microbiology, 2009. **58**(11): p. 1529-1530.
79. Zacharias, N.M., I.D. Athanassaki, H. Sangi-Haghpeykar, and M.O. Gardner, *High false-positive rate of human immunodeficiency virus rapid serum screening in a predominantly hispanic prenatal population*. Journal of Perinatology, 2004. **24**(12): p. 743-747.
80. Bernard M. Branson, H. Hunter Handsfield, Margaret A. Lampe, Robert S. Janssen, Allan W. Taylor, Sheryl B. Lyss, Jill E. Clark, and C.f.D.C.a. Prevention. *Revised recommendations for HIV testing of adults, adolescents, and pregnant women in health-care settings*. MMWR Recommend. 2006; Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5514a1.htm>.
81. Sankar, A., A. Nevedal, S. Neufeld, R. Berry, and M. Luborsky, *What do we know about older adults and HIV? a review of social and behavioral literature*. AIDS Care, 2011. **23**(10): p. 1187-1207.
82. Weber, B., A. Berger, H. Rabenau, and H.W. Doerr, *Evaluation of a new combined antigen and antibody human immunodeficiency virus screening assay, VIDAS HIV DUO Ultra*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(4): p. 1420-6.

83. Bromberger, J.T., K.A. Matthews, L.H. Kuller, R.R. Wing, E.N. Meilahn, and P. Plantinga, *Prospective Study of the Determinants of Age at Menopause*. American Journal of Epidemiology, 1997. **145**(2): p. 124-133.
84. Alehagen, U., U. Dahlström, and T.L. Lindahl, *Cystatin C and NT-proBNP, a powerful combination of biomarkers for predicting cardiovascular mortality in elderly patients with heart failure: results from a 10-year study in primary care*. European Journal of Heart Failure, 2009. **11**(4): p. 354-360.
85. Dwyer, R., *The ADVIA Centaur® infectious disease assays: a technical review*. Journal of Clinical Virology, 2004. **30**, **Supplement 1**(0): p. S1-S4.
86. Walensky, R.P., E.S. Rosenberg, M.J. Ferraro, E. Losina, B.D. Walker, and K.A. Freedberg, *Investigation of Primary Human Immunodeficiency Virus Infection in Patients Who Test Positive for Heterophile Antibody*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **33**(4): p. 570-572.
87. Zacharias, N.M., I.D. Athanassaki, H. Sangi-Haghpeykar, and M.O. Gardner, *High False-positive Rate of Human Immunodeficiency Virus Rapid Serum Screening in a Predominantly Hispanic Prenatal Population*. J Perinatol, 2004. **24**(12): p. 743-747.